

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwissler

**Veränderungen leukozytärer Subpopulationen bei
herzchirurgischem Eingriff mit extrakorporaler Zirkulation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Hans Peter Richter

München 2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Manfred Thiel

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Matthias Angstwurm
Priv. Doz. Dr. med. Paolo Brenner
Prof. Dr. med. Reinhard Lorenz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ines Kaufmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	7
1.1	Systemische Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass	7
1.2	Pathophysiologie der systemischen Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass	10
1.3	Fragestellung	16
2.0	Studiendesign und Statistik	17
2.1	Prinzip der Durchflußzytometrie	17
2.2	Datenauswertung	18
2.3	Studiendesign und Patientenkollektiv	19
2.4	Studienkonzept	20
2.5	Messzeitpunkte	22
2.6	Statistik	23
3.0	Methodik	24
3.1	Probengewinnung	24
3.2	Immunologische Parameter des unspezifischen Immunsystems	24
3.2.1	Bestimmung von β_2 -Integrinen und L-Selektinen auf PMNL	24
3.2.2	Bestimmung der zymosan- und opsonisations-induzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL	25
3.2.3	Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL	28
3.2.4	Spontan und durch lösliche Simuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion	30
3.3	Immunologische Parameter des spezifischen Immunsystems	32
3.3.1	Bestimmung lymphozytärer Subpopulationen anhand des Simultest IMK	32
3.3.2	Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten	34
4.0	Ergebnisse	37
4.1	Klinisches Labor und Patientendaten	37
4.2	Parameter der unspezifischen Immunantwort	39
4.2.1	Bestimmung der Leukozytensubpopulationen in Vollblut	40
4.2.2	β_2 -Integrine und L-Selektine auf PMNL	42

4.2.3	Zymosan- und opsonisations-induzierte Adhärenz und Phagozytosefähigkeit von PMNL	43
4.2.4	Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL	46
4.2.5	Spontan und durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion von PMNL	48
4.3	Parameter der spezifischen Immunantwort	50
4.3.1	Bestimmung lymphozytärer Subpopulationen	50
4.3.2	Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten	53
5.0	Diskussion	61
5.1	Studiendesign und Patientenkollektiv	61
5.2	Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses auf das unspezifische Immunsystem	62
5.2.1	Leukozytäre Subpopulationen und deren Veränderungen	62
5.2.2	Expression der Oberflächenantigene β_2 -Integrine und L-Selektine auf PMNL	63
5.2.3	Zymosaninduzierte Adhärenz und Phagozytosefähigkeit von PMNL	64
5.2.4	Effekt der Opsonisation auf die zymosaninduzierte Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit	66
5.2.5	Effekt der Fremdopsonisation auf die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL	67
5.2.6	Spontan und durch lösliche, rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Stimuli induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL	68
5.3	Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses auf das spezifische Immunsystem	70
5.3.1	Veränderungen von lymphozytären Subpopulationen	70
5.3.2	Veränderungen von zytokinproduzierenden T-Lymphozyten	71
5.4	Perioperative Beeinflussung immunologischer Veränderungen	73
5.4.1	Einfluss von Stress auf das Immunsystem bei herzchirurgischem Eingriff	73
5.4.2	Beeinflussung des Immunsystems durch die zur Narkose eingesetzten Medikamente	74
5.4.3	Einfluss von Katecholaminen auf das Immunsystem bei herzchirurgischem Eingriff	75
5.4.4	Ausblicke und Therapieoptionen bei herzchirurgischem Eingriff	76
5.4.4.1	Koronare Revaskularisation ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine	76

5.4.4.2	Therapieoptionen während herzchirurgischer Eingriffe	79
6.0	Zusammenfassung	79
7.0	Inkubationen	81
7.1	Bestimmung von β_2 -Integrinen und L-Selektinen	81
7.2	Zymosan- und opsonisations-induzierte Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL	81
7.3	Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL	82
7.4	Spontan und durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion	82
7.5	Bestimmung leukozytärer Subpopulationen anhand des Simultest TM IMK	83
7.6	Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten	83
8.0	Geräte und Material	84
8.1	Geräte	84
8.2	Laborbedarf	84
8.3	Puffer und Lösungen	85
8.4	Reagenzien	86
8.4.1	Antikörper	86
8.4.2	Reagenzien	86
9.0	Perioperative Algorithmen	89
9.1	Algorithmus zur Volumensubstitution / Katecholamingabe	89
9.2	Algorithmus für die perioperative mechanische Ventilation	89
9.3	Algorithmus für die Extubation	90
9.4	Algorithmus für das postoperative Abschalten des Pacers	90
9.5	Algorithmus für die Verlegung von Intensivstation auf Normalstation	90
9.6	Algorithmus für die Krankenhausentlassung	90
10.0	Abkürzungen	91
11.0	Literaturverzeichnis	94

12.0	Danksagung	106
13.0	Lebenslauf	107

1.0 Einleitung

1.1 Systemische Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass

Herzchirurgische Eingriffe, unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, provozieren eine ausgeprägte Reaktion des Immunsystems. Die systemische Inflammation wird durch den Kontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche der Bypasszirkulation, durch den Ischämie-Reperfusionsschaden, durch Endotoxinämie sowie das operative Trauma verursacht [30]. Durch die Freisetzung verschiedener humoraler und zellulärer Faktoren kommt es zu einer komplexen Serie von Reaktionen mit dem Ziel, die Gewebeschädigung zu begrenzen, Fremdsubstanzen zu eliminieren und über Reparaturmechanismen den Gesamtorganismus wieder in eine normale Funktion zu bringen. Während der Begriff der Sepsis klassischerweise als Antwort des Organismus auf eine Infektion verwendet wird, kann eine ähnliche Antwort ohne Nachweis einer Infektion entstehen und wird als *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) bezeichnet [15]. Dieser Prozess wird als eine generalisierte, unspezifische, inflammatorische Reaktion des Immunsystems verstanden.

Der Begriff *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) wird als die Folge einer Gewebeschädigung unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache verstanden. Kommen zudem wichtige prognostische Faktoren, wie der Nachweis einer Infektion oder eine Verminderung des Blutdrucks hinzu, so wird zwischen unkompliziertem SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock unterschieden. In der Konsensus-Konferenz des *American College of Chest Physicians* der *Society of Critical Care Medicine* wurden diese pathophysiologischen Zusammenhänge 1991, wie unten aufgeführt, neu definiert und gegliedert [15].

SIRS („systemic inflammatory response syndrome“): mindestens zwei der folgenden Bedingungen müssen erfüllt sein

- Temperatur > 38° oder <36°C
- Pulsfrequenz > 90 /min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/min oder PaCO₂ < 32 mmHg
- Leukozyten > 12.000 /mm³ oder < 4000/mm³, oder >10% unreife Zellformen

Sepsis: Der Patient erfüllt die Bedingungen eines SIRS bei gleichzeitigem Nachweis einer Infektion.

Schwere Sepsis: Der Patient erfüllt die Bedingungen einer Sepsis und es besteht zusätzlich eine Organdysfunktion, Hypotension oder Minderperfusion.

Septischer Schock: Der Patient erfüllt die Bedingungen der Sepsis und ist trotz adäquater Volumensubstitution hypoton (RR systolisch <90 mmHg). Erhält der Patient vasokonstriktive Substanzen, kann die Phase der Hypotension nicht exakt ermittelt werden, der Patient wird auch hier als im septischen Schock betrachtet.

Abb. 1: Definition von SIRS, Sepsis, Schwerer Sepsis und Septischem Schock der Konsensus Konferenz des American College of Chest Physicians der Society of Critical Care Medicine

Eine häufige Komplikation des SIRS sind einzelne Organdysfunktionen, wie Lungenschädigung, Nierenversagen oder das Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS). Aus einem Bericht der *Society of Thoracic Surgeons* ging hervor, dass 20 Prozent aller Patienten nach herzchirurgischem Eingriff, die als Patienten mit niedrigem Risiko eingestuft wurden, postoperative Komplikationen aufwiesen [57]. Koller et al. gaben die Inzidenz von MODS nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine mit 11 Prozent an. Die Mortalitätsrate dieser Patienten stieg dabei auf 41 Prozent. Die Autoren postulierten, dass das MODS der beste Prädiktor von Mortalität für Patienten nach herzchirurgischem Eingriff ist [88]. Faktoren, wie die genetische Prädisposition, der Schwierigkeitsgrad der Operation oder der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten beeinflussen das Ausmaß der perioperativen Komplikationen. Neben einem stabilen hämodynamischen Management gilt die inflammatorische Antwort des Organismus als der Einflussfaktor, der prinzipiell reversibel ist und daher im Fokus zahlreicher Studien und Untersuchungen liegt.

Dabei sind die Pathomechanismen, die die inflammatorische Antwort als Reaktion des Organismus beeinflussen, nicht vollständig aufgeklärt. Ziel ist es, bestimmte Patientengruppen, die zum Teil lebensbedrohliche Komplikationen nach herzchirurgischem Eingriff aufweisen, früher zu identifizieren. Die Verknüpfung zwischen generalisierter

unspezifischer Inflammation und sich daraus ergebenden Folgekrankheiten wird in der Literatur auf folgende Gründe zurückgeführt.

Durch den initialen Insult der extrakorporalen Zirkulation kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor Nekrosefaktor- α (TNF- α). Diese Primärantwort wird durch die Freisetzung einer Vielzahl von sekundären Mediatoren, wie zirkulierenden als auch lokalen, humoralen und zellulären Komponenten verstärkt [99]. Dazu gehören die Kontaktaktivierung der Thrombozyten und der Gerinnungskaskade, die zu Mikrothromben und einer Thrombopenie führen können.

Zudem werden durch den kardiopulmonalen Bypass Endotoxine freigesetzt. Endotoxine können sowohl das Komplementsystem, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, als auch erneut die Gerinnungskaskade aktivieren. Zusätzlich kommt es zur Stimulation des Kinin-Kallikrein- und des Fibrinolyse-Systems. Als Folge der Aktivierung dieser Kaskadensysteme und der Thrombozyten-, Leukozyten- und Endothelzellinteraktion kommt es zu einem Efflux von neutrophilen Granulozyten ins Interstitium, um dort eine Entzündungsreaktion zu bewirken [111].

Die so gestörte Endothelbarriere führt zu einem Verlust von Plasmaproteinen und Flüssigkeit ins Interstitium. Durch diesen Verlust werden einzelne Organsysteme minderversorgt und die daraus resultierende Hypotension kann einen unkontrollierten Prozess der Inflammation induzieren [16, 120].

Zur Vermeidung eines überschießenden Effekts kommt es neben dieser Hyperinflammation zu einer antiinflammatorischen Gegenregulation. Dies geschieht durch die Bildung antiinflammatorischer Substanzen wie löslichen TNF- α -Rezeptoren, Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), sowie durch programmierten Zelltod (Apoptose) immunkompetenter Zellen [146].

Überwiegt im weiteren Verlauf dieser Prozess der antiinflammatorischen Gegenreaktion, so mündet dies in eine Hypoinflammation mit der Gefahr, den Organismus anfällig für Infektionen zu machen [17].

1.2 Pathophysiologie der systemischen Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass

Neben unspezifischen Faktoren, wie dem Ausmaß des operativen Traumas, Blutverlust, Transfusionen oder Hypothermie, gibt es im Wesentlichen drei Mechanismen, die die inflammatorische Antwort des Immunsystems nach extrakorporaler Zirkulation spezifisch bestimmen.

Durch Exposition des Blutes mit der Fremdoberfläche der Herz-Lungen-Maschine kommt es zu einer direkten Kontaktaktivierung von zellulären und humoralen Blutkomponenten [112]. Der Ischämie-Reperfusionsschaden, der durch das Abklemmen der Aorta entsteht, aktiviert direkt das Immunsystem. Hiervon sind vor allem das Gehirn, das Herz, die Lungen, die Nieren und die Leber betroffen [26, 91, 92].

Durch Minderperfusion des Splanchnikusgebiets des Gastrointestinaltrakts entsteht eine Translokation, wodurch Endotoxine in den Blutkreislauf gelangen. Die Endotoxinämie aktiviert indirekt Leukozyten und Endothel [95, 133]. Zudem korreliert die Konzentration von Endotoxinen eng mit der Inzidenz von postoperativen kardiovaskulären Dysfunktionen [100].

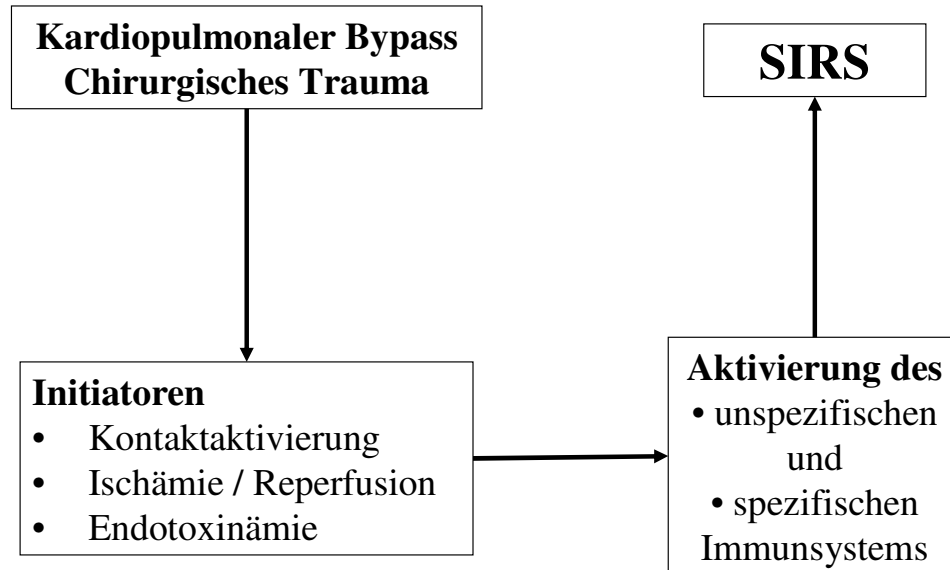


Abb. 2: Der Kardiopulmonale Bypass führt über die Stimulation des unspezifischen und spezifischen Immunsystems zu SIRS.

Nachdem diese Faktoren das Immunsystem stimuliert haben, kommt es zur Aktivierung des unspezifischen und spezifischen Immunsystems. Dadurch werden Schlüsselreaktionen, die eine Freisetzung von Komplementfaktoren sowie von Zytokinen nach sich ziehen, in Gang gesetzt. Außerdem erfolgt die Freisetzung von Sauerstoffmonoxid (NO) sowie die Aktivierung des Koagulations- und Fibrinolysesystems und des Endothels. Die Hauptreaktion besteht allerdings in der zellulären Immunantwort [89].

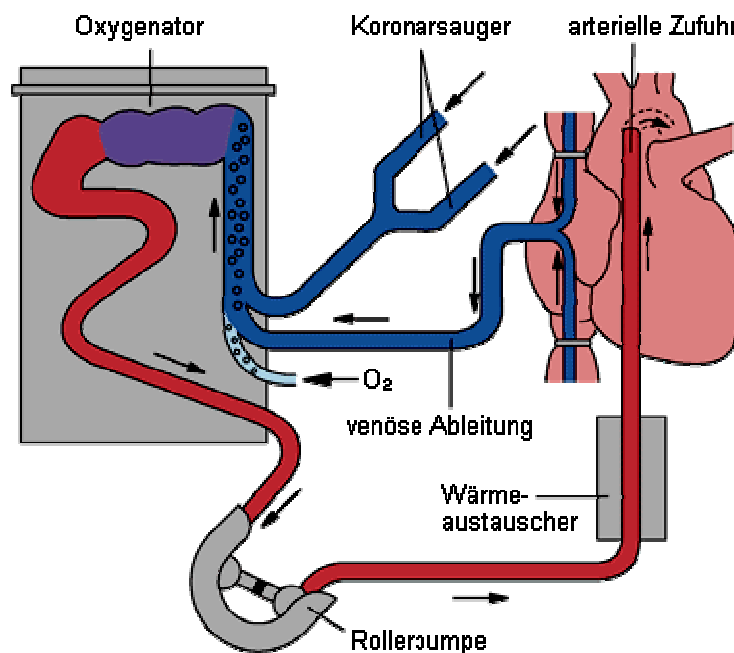


Abb. 3: Schematische, vereinfachte Darstellung der extrakorporalen veno-arteriellen Zirkulation: venöses, sauerstoffarmes Blut wird über die untere und obere Hohlvene über die venöse Kanülierung angesaugt und im Oxygenator mittels Membranoxygenierung mit Sauerstoff aufgesättigt und von Kohlendioxid gereinigt. Zusätzlich werden zwei Sauger (Koronarsauger) eingesetzt, um verloren gegangenes Blut ebenfalls dem Reservoir und damit dem Oxygenator zur Verfügung stellen zu können. Der Bluttransport wird durch die Rollerpumpe betrieben. Die Bluttemperatur wird über einen Wärmeaustauscher zur Kühlung oder Wiedererwärmung des Patienten reguliert.

Komplementfaktoren werden während der extrakorporalen Zirkulation durch direkte Kontaktaktivierung vor allem über den alternativen Signalweg aktiviert und zählen zur humoralen Komponente der unspezifischen Abwehr [25, 56].

Zytokine als parakrine Botenstoffe des Immunsystems werden durch eine große Anzahl an verschiedenen Zelltypen, wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen produziert. Proinflammatorische Zytokine wie $TNF-\alpha$ oder Interleukin- 1β , Interleukin-6 und

Interleukin-8 sind prognostisch von hoher Wertigkeit im Zusammenhang mit komplizierenden Folgeschäden nach herzchirurgischen Eingriffen [79, 98, 121]. Der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen folgt eine Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen. Eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine im Zusammenhang mit kardiochirurgischen Eingriffen ist Interleukin-10. Mc Bride et al. formulierten die Hypothese, dass das Zusammenspiel und die Höhe der Ausschüttung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen die Prognose nach Herzoperationen bestimmen [99].

Sauerstoffmonoxid (NO) ist ein ubiquitärer Mediator, der regulierende Funktion sowohl als starker Vasodilatator im systemischen und pulmonalen Kreislauf hat, als auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Die Produktion von NO erfolgt durch die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) und ist hauptsächlich von einem pulsatilem Fluss der Herz-Lungen-Maschine abhängig [69]. Die immunmodulatorischen Eigenschaften von NO sind komplex, aber überwiegend schädlich. Neben der Produktion von Sauerstoffradikalen trägt die induzierbare, myokardiale NO Synthetase (iNOS) zu einer verminderten myokardialen Kontraktilität durch Zytokinfreisetzung bei [7, 48].

Die **Koagulations-Fibrinolyse-Kaskade** reagiert durch Aktivierung der Gerinnung als eine Schlüsselreaktion auf die akute Inflammation. Der kardiopulmonale Bypass aktiviert die Gerinnungskaskade über den intrinsischen Weg.

Endothelzellen regulieren und dirigieren die Passage von Leukozyten durch Expression von Oberflächenantigenen und Sekretion von löslichen Mediatoren in entzündete Gewebe. Inflammation nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ist durch eine ausgeprägte Aktivierung der Endothelzellen und durch eine diffuse endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet [8]. Die Expression von Oberflächenantigenen auf Endothelzellen fördert die Adhärenz von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMNL) und führt zu deren Aktivierung und Degranulation. Dieser Prozess kann wiederum das Endothel schädigen und zum *capillary leak syndrom* mit Ödembildung und Mikrozirkulationsstörungen beitragen [18].

Die **zelluläre, angeborene Immunantwort** ist der zentrale Bestandteil der Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass und wird durch PMNL bestimmt. Im inaktivierten Zustand zirkulieren PMNL in der Mitte der postkapillären Venolen mit einer Geschwindigkeit von 1000 $\mu\text{m/s}$. Nach Aktivierung rollen die Leukozyten förmlich über die Endothelien mit einer Geschwindigkeit von 30 $\mu\text{m/s}$. Diese Interaktion wird durch die Expression von P- und E-Selektinen auf der Seite der Endothelzellen und L-Selektinen auf PMNL vermittelt. Zur

Stabilisierung der Adhärenz exprimieren PMNL α - und β -Integrine (CD11a/CD18 und CD11b/CD18) [43]. Dadurch können sie transmigrieren, degranulieren und Mikroorganismen in Phagosomen einschließen. Die Degranulation von PMNL bewirkt die Freisetzung zytotoxischer Proteasen, wie Elastase, Myeloperoxidase und von reagiblen Sauerstoffradikalspezies. Durch den Einschluß von Mikroorganismen werden Keime durch Sauerstoffradikalspezies abgetötet.

Das membranständige Enzym Nikotin-adenin-dinukleotid-phosphat-hydrogen (NADPH) Oxidase produziert Sauerstoffradikalspezies sowohl rezeptorvermittelt, als auch rezeptorunabhängig im Phagosomen. Es entstehen Superoxidanionen, die entweder spontan oder enzymatisch in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Dies wird als *respiratory burst* bezeichnet [140]. Durch Interaktion von Wasserstoffperoxid mit dem Enzym Myeloperoxidase (MPO) und anderen Substanzen wie Tyrosin oder Chlorid entstehen weitere hoch bakterizide Sauerstoffradikalspezies [85]. Durch Inversion der Zellmembran und der dadurch bedingten Bildung von Phagosomen können Mikroorganismen verdaut werden, ohne angrenzendes, gesundes Gewebe zu schädigen [76].

Im Rahmen einer systemischen Inflammation werden überschießende Entzündungsmediatoren, wie Zytokine oder Komplementfaktoren gebildet. Da es sich hierbei um lösliche Botenstoffe handelt, führen sie nicht zur Aufnahme in Phagosomen, sondern sie stimulieren die NADPH-Oxidase auf der gesamten Zellmembran mit der Folge einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen in den extrazellulären Raum [68].

Somit besitzen PMNL eine ambivalente Rolle in der Abwehr. Auf der einen Seite töten sie Mikroorganismen durch ihre mikrobizide Funktion ab und verhindern so eine Infektion. Auf der anderen Seite schädigen zytotoxische Sauerstoffradikalspezies, die extrazellulär freigesetzt werden, in erheblichem Maße den Organismus.

Neben PMNL weisen Makrophagen als auch Natürliche Killerzellen des angeborenen Immunsystems eine erhöhte spontane Aktivität nach kardiopulmonalem Bypass auf und tragen damit zu einer Verstärkung des *respiratory burst* bei [140].

Nicht nur das unspezifische Immunsystem, sondern auch das spezifische Immunsystem wird durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine aktiviert (zur Einteilung und Charakteristik siehe auch Abbildung 4).

	Angeboren	Erworben
Charakteristika		
Gedächtnis	nein	ja
Spezifität	gering	10 ⁹ verschiedene Antigene
Komponenten		
Humoral	- Komplement - Gerinnung/Fibrinolyse - akute Phase Proteine	Antikörper
Zellulär	- Phagozyten - NK-Zellen	B-Lymphozyten (CD19+) T- Lymphozyten (CD3+)
Marker-Zytokine		
pro-inflammatorisch	TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8	IL-2, IFN- γ
anti-inflammatorisch	IL-4, IL-10	IL-4, IL-10

Abb. 4: Charakteristika und Komponenten der spezifischen und unspezifischen Immunität

Neben der Antikörperbildung durch B-Lymphozyten spielt die Aktivierung von T-Lymphozytensubpopulationen im Rahmen einer systemischen Inflammation durch den kardiopulmonalen Bypass eine entscheidende Rolle. Normalerweise eliminieren zytotoxische T-Killerzellen spezifisch körpereigene Zellen, die von Erregern befallen wurden. T-Helferzellen aktivieren Makrophagen, stimulieren B-Lymphozyten und setzen Zytokine frei, die die Abwehrreaktion modulieren. Insofern sind sie auch an humoralen Abwehrmechanismen beteiligt und beeinflussen in erheblichem Maß durch Zytokinliberation unspezifische, zelluläre Mechanismen.

Bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen konnten Veränderungen in der Funktion von T-Helferzellen nachgewiesen werden. T-Helferzellen produzierten insgesamt weniger Zytokine nach einer Herzoperation als davor [93, 104].

Zusammengefasst kommt es durch die extrakorporale Zirkulation zu einer Interaktion des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Humorale und zelluläre Mechanismen beeinflussen sich gegenseitig und führen insgesamt zu einer systemischen Inflammation. Diese Veränderungen führen im Normalfall nicht zu komplizierenden Folgekrankheiten nach

herzchirurgischem Eingriff. Es gibt allerdings eine Reihe von Patienten, die postoperativ Komplikationen entwickeln. Von großer Wertigkeit wäre es daher, diese Patienten frühzeitig durch ein immunologisches Monitoring zu identifizieren und durch präventive Maßnahmen schützen zu können [94].

1.3 Fragestellung

Durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt es im Rahmen einer kardiochirurgischen Operation zu einer Reihe von Veränderungen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems.

Da es zu keiner direkten Infektion durch pathogene Keime während einer Herzoperation kommen sollte, müsste sich eine Inflammation vor allem durch gesteigerte Aktivität der Funktionen des unspezifischen Immunsystems nachweisen lassen. Gleichzeitig kann vermutet werden, dass eine direkte Zellschädigung des spezifischen Immunsystems zu einer Immunsuppression führen kann.

Aus diesen Überlegungen heraus lassen sich folgende Fragen formulieren:

- 1.) Beantworten klinische Routinelaborparameter die Frage, ob es nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei einer Standard-Bypass-Operation zu einer systemischen Inflammation gekommen ist?
- 2.) Wann treten Veränderungen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort nach kardiopulmonalem Bypass auf?
- 3.) Welche Funktionen des unspezifischen bzw. spezifischen Immunsystems werden aktiviert bzw. supprimiert?

2.0 Studiendesign und Statistik

2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Zellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. So können, unabhängig von der untersuchten Zellart, eine Reihe von physikalischen und chemischen Eigenschaften zeitgleich determiniert werden. Hierzu zählen die Granularität, Größe, Beschaffenheit von Zelloberflächen sowie die antigenetische Zusammensetzung [54, 74].

Das Fliesssystem des FACScanTM führt die zu untersuchenden Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm, welches von einem Argonlaser emittiert wird (siehe Abbildung 5).

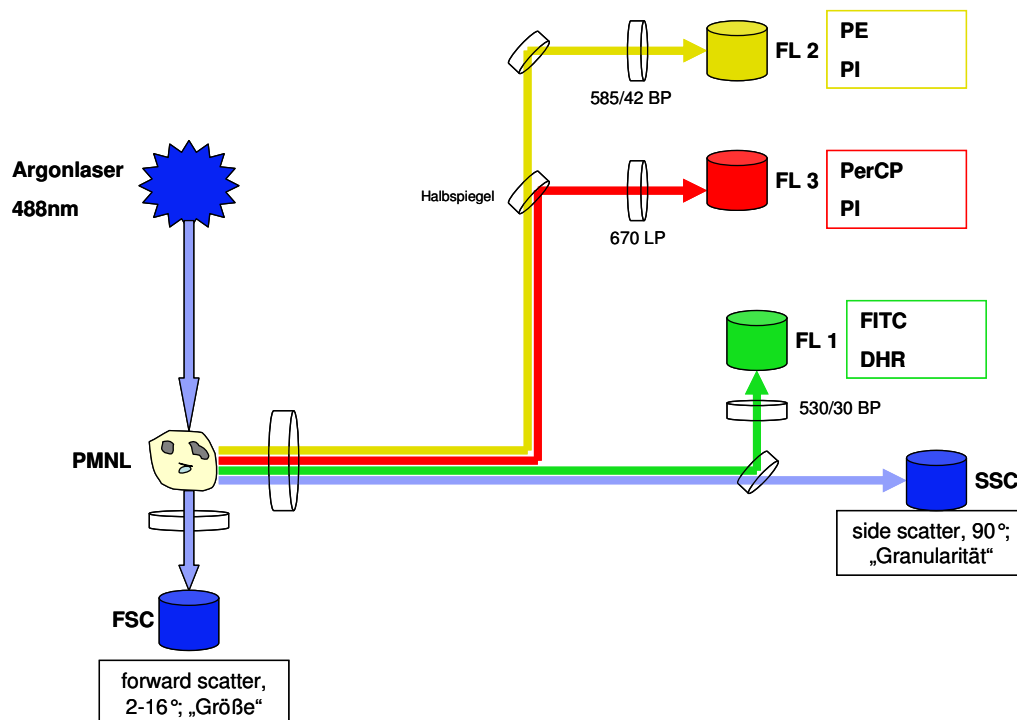


Abb. 5: Darstellung des Prinzips des FACScanTM: emittierte Photonen von Zellen, erzeugt durch Argonlaser, werden in verschiedenen Winkeln (FSC, SSC) und Fluoreszenzkanälen (FL1-3) detektiert und in Spannungsimpulse gewandelt; PMNL: Polymorphkernige Leukozyten, BP: Bandpaß, LP: Langpaß.

Passieren Zellen dieses Licht, werden durch die Streuung Lichtsignale generiert, die mit Hilfe der Detektionsoptik zu spezifischen Detektoren gelenkt werden. Optische Signale werden so in Spannungsimpulse umgewandelt [13]. Der entstehende Spannungsimpuls wird nach Höhe,

Fläche oder Weite analysiert, um anschließend an die angeschlossene Computereinheit in digitalisierter Form übermittelt zu werden und so ausgewertet werden zu können.

Das Engwinkelstreulicht (*forward scatter*) erfasst die Partikelgröße und den Brechungsindex der Zelle, das 90°-Streulicht (*side scatter*) die Granularität der Zelle. Im rechten Winkel werden Streulicht und Fluoreszenz im Kanal 1 bis 3 (FL1 - FL3) gemessen, wobei die entstehenden geringen Lichtmengen Photomultiplier zur Verstärkung benötigen.

Bei der Mehrfarbenanalyse ist die Auftrennung der Fluoreszenzspektren bei mehreren fluorochromierten Antikörpern erforderlich. Diese wird durch dichrote Teilerspiegel und Filter erreicht. Die Signale der unterschiedlichen Fluochrome (siehe Tabelle 1) überlappen hierbei teilweise. Mittels prozentualer Kompensation auf Verstärkerebene wird diese Überlappung substrahiert, um eine Quadrantendarstellung von reinen Fluorochromen zu erhalten [105].

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emmissionsmaxima [nm]	Abkürzung
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
Peridin Chlorophyll	490	675	PerCP
Phycoerythrin	480; 565	578	PE
Propidiumjodid	550	650	PI

Tab. 1: (Quelle: <http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de>)

2.2 Datenauswertung

Nach Abschluss des Messvorgangs werden die Daten durch Übermittlung an eine Computereinheit anhand graphischer *dot-plot* Diagramme und Histogramme ausgewertet.

Durch Analog-zu-Digital-Konvertierung werden bei diesem System die Mess-Signale in 1024 dimensionslosen Kanälen gerastert, und man erhält so „Punktwolken“. Jeder Punkt entspricht dabei einem sog. *event*, also einer gemessenen Zelle bestimmter Eigenschaften. Die Gegenüberstellung von *FSC* (Zellgröße) und *SSC* (Granularität) gibt Aufschluss über die Art der verschiedenen Zellpopulationen der zu untersuchenden Probe [115]. Anschließend wird eine Vorauswahl der Zellen getroffen, die es zu untersuchen gilt, und man grenzt durch ein Software-Fenster, das sogenannte *Gating*, die Zellen voneinander ab [105]. Danach werden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Zellen anhand des Histogramms der einzelnen Fluoreszenzkanäle gegenübergestellt und als Messwert definiert (siehe Abbildung 6).

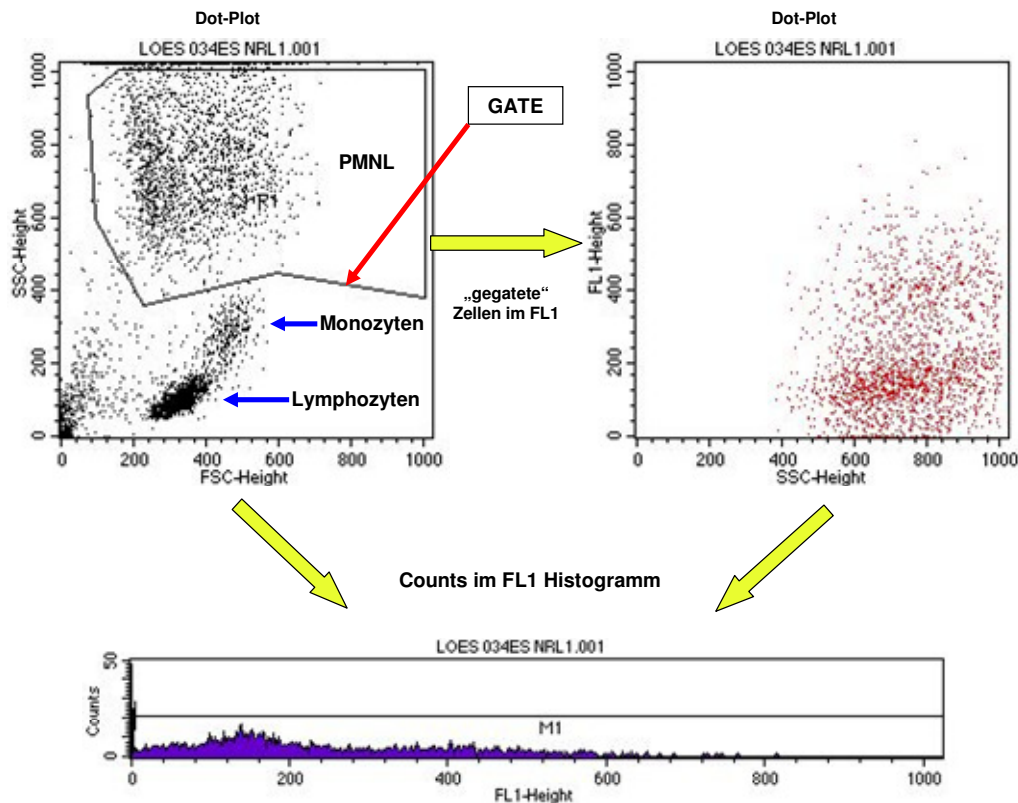


Abb. 6: Dargestellt ist eine *dot-plot* Graphik zur Identifizierung der polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) im SSC zu FSC, eine weitere *dot-plot* Graphik der PMNL im SSC zu FL1, sowie ein Histogramm zur Berechnung der Fluoreszenzintensitäten für diese gegatete Zellen im Fluoreszenzkanal 1 (FL1).

2.3 Studiendesign und Patientenkollektiv

Die Daten der Messungen dieser Dissertation stammen aus der Kontrollgruppe einer single-center, prospektiven, randomisierten, doppelblinden Parallelgruppenstudie der Pharmafirma Fresenius Kabi Austria GmbH mit der Studiennummer 01-OMVE-003.

Insgesamt wurden 40 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 20 Patienten eine 10% Omegaveninfusion mit ω -3 Fettsäuren und 20 Patienten der Kontrollgruppe eine 2,5% Lipid-Emulsion als Referenzmedikation erhielten.

Die Genehmigung zur Durchführung der Studie wurde am 26. Oktober 2001 durch die unabhängige Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München erteilt. Die Daten wurden im Zeitraum vom 9. Februar 2002 bis zum 18. Dezember 2002 an der herzchirurgischen Stiftsklinik am Augustinum durch die Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität erhoben. Die Entblindung erfolgte am 25. Oktober 2004.

2.4 Studienkonzept

In die Studie wurden weibliche und männliche Patienten zwischen 18 und 75 Jahren eingeschlossen, die sich einer elektiven, koronaren Bypassoperation (Anzahl der Bypässe ≥ 3 und ≤ 5) unterziehen mussten.

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Parameter wurden als Ausschlußkriterien definiert (siehe Tabelle 2).

Allgemeine Ausschlußkriterien	Spezielle Ausschlußkriterien
Teilnahme an anderer klinischer Studie 1 Monat vorher	Bekannte Hypersensibilität gegenüber Bestandteilen der Studienmedikation
Psychiatrische Erkrankungen	Gesamt Bilirubin $> 1,5$ mg/dl
Epilepsie	Serum-ASAT und/oder -ALAT > 50 U/l
Verdacht auf Drogenabusus	Serum-Kreatinin $> 1,5$ mg/dl
Alkoholabusus, definiert als tägliche Einnahme von mehr als 40 ml Ethanol	Body Mass Index < 18 kg/m ² oder > 30 kg/m ² oder Körpergewicht > 100 kg
Derzeitiger Nikotinabusus	Troponin I $> 2,5$ ng/ml
Schwangerschaft	Angiographie innerhalb von 24 Stunden vor Studienstart
Frauen in der Stillzeit	Immunologische Erkrankungen, die therapiert werden
Einnahme von Kontrazeptiva	Thrombozytopenie: Thrombozytenzahl $< 150 \times 10^9/l$
Kooperationsunfähigkeit	Vorbestehender septischer Fokus oder SIRS
	Herzschrittmacher
	Kürzlicher Myokardinfarkt
	Instabile Angina pectoris
	Ejektionsfraktion des linken Ventrikels $< 30\%$
	Hypertriglyceridämie und/oder Triglyceride > 250 mg/dl
	Serum Pseudocholinesterase < 2500 U/l

Tab. 2: Allgemeine und spezielle Ausschlußkriterien der Studie

Alle Patienten erhielten nach Anlage eines Katheters zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks in Lokalanästhesie eine Vollnarkose. Für die Einleitung der Narkose wurde allen Patienten das Opioid Sufentanil (Dosierung $0,7 - 2$ µg/kg KG i.v.), das Benzodiazepin Midazolam (Dosierung $0,15 - 0,2$ mg/kg KG i.v.) und das Muskelrelaxans Pancuronium (Dosierung $0,1$ mg/kg KG i.v.) appliziert. Für die Aufrechterhaltung der Narkose wurde das volatile Anästhetikum Isofluran (Dosierung $0,8 - 1,2$ Vol% endexpiratorisch) und Sufentanil (Dosierung $0,7$ µg/kg KG/h) verwendet. Die Instrumentierung der Patienten erfolgte nach endotrachealer Intubation mittels eines dreilumigen zentralen Venenkatheters und einem Blasenkatheter. Bei allen Patienten wurde

eine Herz-Lungen-Maschine (Stockert S3, Sorin Group GmbH) mit einem Membranoxygenator (Affinity NT 511T, Medtronic GmbH) eingesetzt.

2.5 Messzeitpunkte

Die Auswirkungen des herzchirurgischen Eingriffes auf das unspezifische und spezifische Immunsystem wurden im sog. *Non-Routine-Labor* (NRL) bestimmt, welches jeweils zu folgenden Messzeitpunkten abgenommen und nach Aufbereitung mittels durchflußzytometrischer Analyse untersucht wurde (siehe Abbildung 7).

- (1) **MZP1:** *Non-Routine-Labor* zum Messzeitpunkt 1, der mindestens 48 Stunden vor der geplanten Operation lag.
- (2) **MZP2:** *Non-Routine-Labor* zum Messzeitpunkt 2, der während der Narkoseeinleitung, kurz vor Beginn des kardiopulmonalen Bypasses lag.
- (3) **MZP3:** *Non-Routine-Labor* zum Messzeitpunkt 3, 6 Stunden postoperativ.
- (4) **MZP4:** *Non-Routine-Labor* zum Messzeitpunkt 4, 24 Stunden postoperativ.
- (5) **MZP5:** *Non-Routine-Labor* zum Messzeitpunkt 5, 48 Stunden postoperativ.

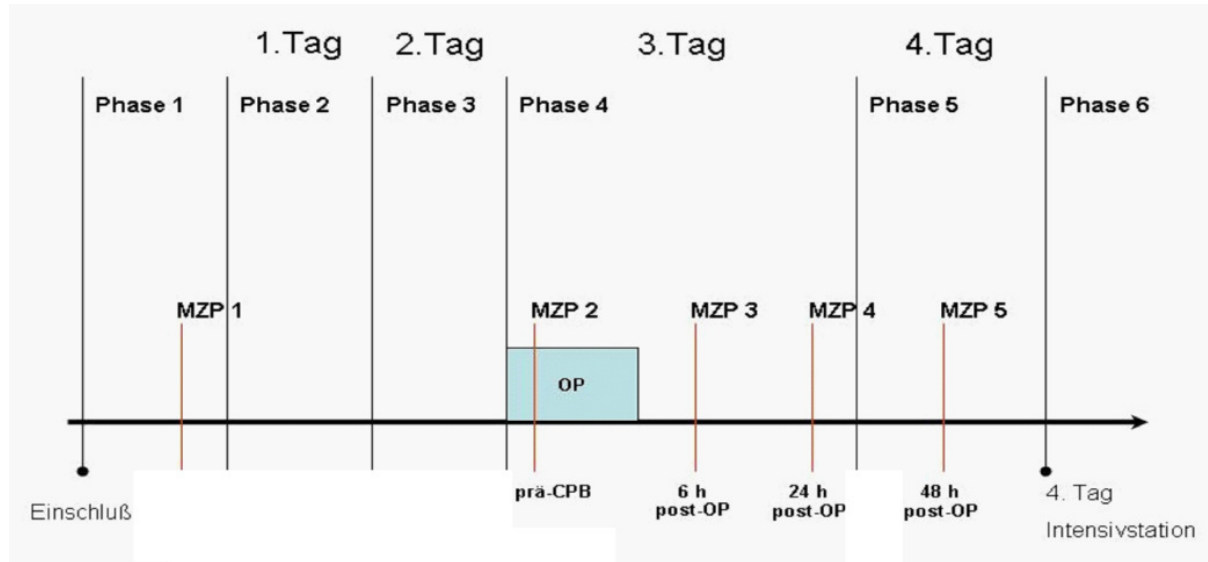


Abb. 7: Graphische Darstellung der Verteilung der einzelnen Messzeitpunkte zum zeitlichen Ablauf vor, während und nach der Operation (OP); CPB: kardiopulmonaler Bypass;

2.6 Statistik

Die Ergebnisse der durch die durchflußzytometrischen Messungen gewonnenen Werte wurden als relative, dimensionslose Einheiten im Listenmodus des FACSTM-Zytometers gespeichert. Dem schloss sich eine graphische Darstellung der Daten mittels der Becton Dickinson Cell QuestTM Pro Software, Version 4.0.2 sowie eine erste deskriptive statistische Bewertung an. Der nächste Schritt beinhaltete die Dokumentation der dadurch erhaltenen Mittelwerte zu jedem Messzeitpunkt für jeden Patienten. Die abschließende statistische Auswertung erfolgte nach Linearisierung der logarithmisch skalierten Ergebnisse mit dem Statistikprogramm SPSS Version 13.0. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SE) dargestellt.

Als erstes wurden die Daten auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Diese Prüfung ergab eine Normalverteilung aller Parameter. Da es sich ausschließlich um verbundene Stichproben handelte, wurden die Ergebnisse mittels zweiseitiger ANOVA Prozedur für wiederholte Messungen im Innersubjektvergleich und anschließender Kontrastierung mittels einfachem Kontrast sowie dem umgekehrtem Helmert-Kontrast analysiert. Bei Mehrfachvergleichen wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni durchgeführt. Als signifikant wurden die Ergebnisse ab $p < 0,05$ gewertet.

Die Ergebnisse wurden anschließend graphisch mit der Software Sigma Plot, Version 10.0, aufbereitet. Zur graphischen Darstellung der prozentualen Verteilung der Leukozytensubpopulationen wurden Balkendiagramme verwendet. Veränderungen von Parametern des Immunsystems im zeitlichen Verlauf wurden mit Liniendiagrammen veranschaulicht.

3.0 Methodik

3.1 Probengewinnung

Für die folgenden Versuche wurde den Patienten zu fünf Messzeitpunkten Blut entnommen. Zum ersten Messzeitpunkt erfolgte dies durch einen peripher gelegten Venenkatheter am Arm, danach über einen zentralen Venenkatheter in der Vena jugularis interna. Für alle folgend aufgeführten Versuche des *Non-Routine-Labor* benötigten wir jeweils ein 2,3 ml EDTA-K Entnahmeröhrchen, sowie 11 ml heparinisiertes Vollblut (Heparin: $c_{\text{end}} = 10 \text{ IE/ml}$). Von den 11ml Vollblut wurden 5 ml sofort in einer Spritze nach Entnahme in Eiswasser gekühlt, der Rest separat bei Raumtemperatur (20-25 °C) gehalten.

3.2 Immunologische Parameter des unspezifischen Immunsystems

3.2.1 Bestimmung von β_2 -Integrinen und L-Selektinen auf PMNL

Die Expression von β_2 -Integrinen (CD18) und L-Selektinen (CD62L) auf humanen polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) kann man mittels durchflußzytometrischer Bestimmung durch Fluorochrom-markierte, spezifische Antikörper messen [139]. Hierzu wurden Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markierte, monoklonale Antikörper verwendet. IB4 ist ein anti-CD18 Antikörper zur Detektion der β_2 -Integrine, Dreg200 ein anti-CD62L Antikörper zur Detektion der L-Selektine [75, 84]. Die Färbung der Zellen erfolgte in heparinisiertem (Heparin: $c_{\text{end}} = 10 \text{ IE/ml}$), eisgekühltem Vollblut, nachdem 2 ml des zu untersuchenden Materials zwei Mal bei 2500 U/min zentrifugiert, gewaschen und mit eisgekühlter HBSS-Pufferlösung auf den Ausgangshämatokrit resuspendiert wurden. Dem schloss sich die Inkubation von 20 μl der Zellsuspension mit je 20 μl der Antikörperlösungen IB4 und Dreg 200 für 20 Minuten auf Eis in 5ml Polypropylen-Röhrchen an. Die Erythrozyten wurden anschließend mit je 750 μl *FACSTTM-Lysing Solution* lysiert.

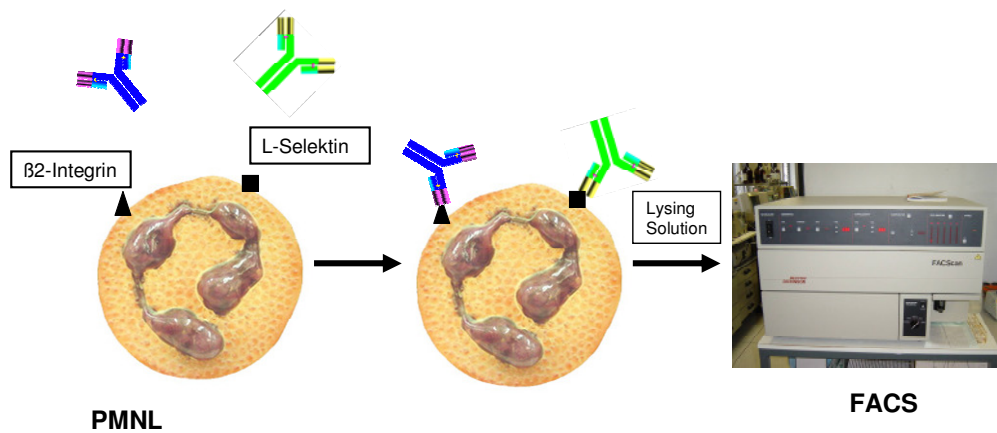


Abb. 8: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung der β_2 -Integrine und L-Selektine auf PMNL (Erläuterungen siehe Text)

Nach abschließendem Waschvorgang mit kalter HBSS-Lösung bei 2500 U/min für fünf Minuten bei 4°C waren die Proben zur Messung bereit (siehe auch Inkubationsschema Abbildung 8 und Abschnitt 7.1, Abbildung 35). Die Auswertung erfolgte, nach Identifikation der polymorphkernigen Leukozyten in der SSC/FSC-Graphik, im Fluoreszenzkanal-1. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde auf den Verstärkungsfaktor eins berechnet.

3.2.2 Bestimmung der zymosan- und opsonisations-induzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL

Zur Quantifizierung der Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL kann man als Ersatz für Mikroorganismen β -glukanreiches Zymosan, ein Zellwandpolysaccharid des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* verwenden [9, 45, 62]. Das in HBSS suspendierte Zymosan mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markiert, dessen Emissionsspektrum nach Anregung im grünen Licht (Fluoreszenzkanal-1) liegt [106].

Als erstes wurde leukozytenreiches Plasma durch Sedimentation gewonnen. Hierzu wurden 3 ml heparinisiertes Vollblut bei Raumtemperatur für 45 Minuten auf Histopaque Ficoll-Dichtegradient geschichtet und anschließend 750 µl unseparierte Leukozyten abpipettiert. Danach wurde der Gehalt an reifen Leukozyten mit dem Coulter Counter mittels volumetrischer Differenzierung bestimmt. Hierzu wurden 10 µl leukozytenreiches Plasma in 10ml azidfreier, stabilisierter Elektrolytlösung (Isoton II, Beckman Coulter) resuspendiert. Leukozyten galten als reif, wenn sie einen Durchmesser zwischen 5,2 µm und 15 µm hatten. Der Gehalt an reifen Leukozyten errechnete sich dann bei einem Probenvolumen von 500 µl als:

$$\text{Leukozyten} / 500 \mu\text{l} \times 2 \times 1000 (\text{Verdünnungsfaktor}^{-1}) = \text{reife Leukozyten} / \text{ml}$$

Die Untersuchung des Einflusses der Opsonisation im Serum erfolgte durch Inkubation der Zymosanpartikel im Plasma der Patienten. Das Plasma wurde durch Zentrifugation von 3 ml Vollblut für fünf Minuten bei 5000 U/min und 4°C hergestellt. Die Menge des verwendeten Zymosans zur Inkubation im Plasma wurde im Verhältnis 1:10 der zuvor bestimmten Menge an Leukozyten hinzugegeben. Die Zymosanpartikel wurden mit je 0,5 ml des Patientenplasmas sowie mit 0,5 ml an Referenzplasma (Fremdplasma) zusammen für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit kalter HBSS Lösung aufgefüllt, bei 5000 U/min für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und so gewaschen. Durch Entfernung des Überstandes wurden so je 100 µl an opsonierter FITC-markierter Zymosansuspension (*plasma treated zymosan / PTZ*) gewonnen.

Je 0,5 ml und zweimal 0,4 ml HBSS-Lösung (vorgewärmt für 10 Minuten bei 37°C) wurden parallel jeweils für 10 Minuten bei 37°C mit 10µl leukozytenreichem Plasma inkubiert. Danach wurde das, wie oben beschrieben, gewonnene FITC-markierte Zymosan und 100 µl der opsonierten Zymosansuspension (PTZ) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeblock gehalten.

Durch Färbung mit dem rotfluoreszenten, membranpermeablen DNS-Farbstoff LDS (LDS: $c_{\text{end}} = 0,2 \mu\text{g/ml}$) erfolgte eine Separation von Erythrozyten oder Thrombozytenaggregaten, und die Proben waren anschließend eiskühlt messbereit (siehe auch Inkubationsschema Abbildung 9 und Abschnitt 7.2, Abbildung 36).

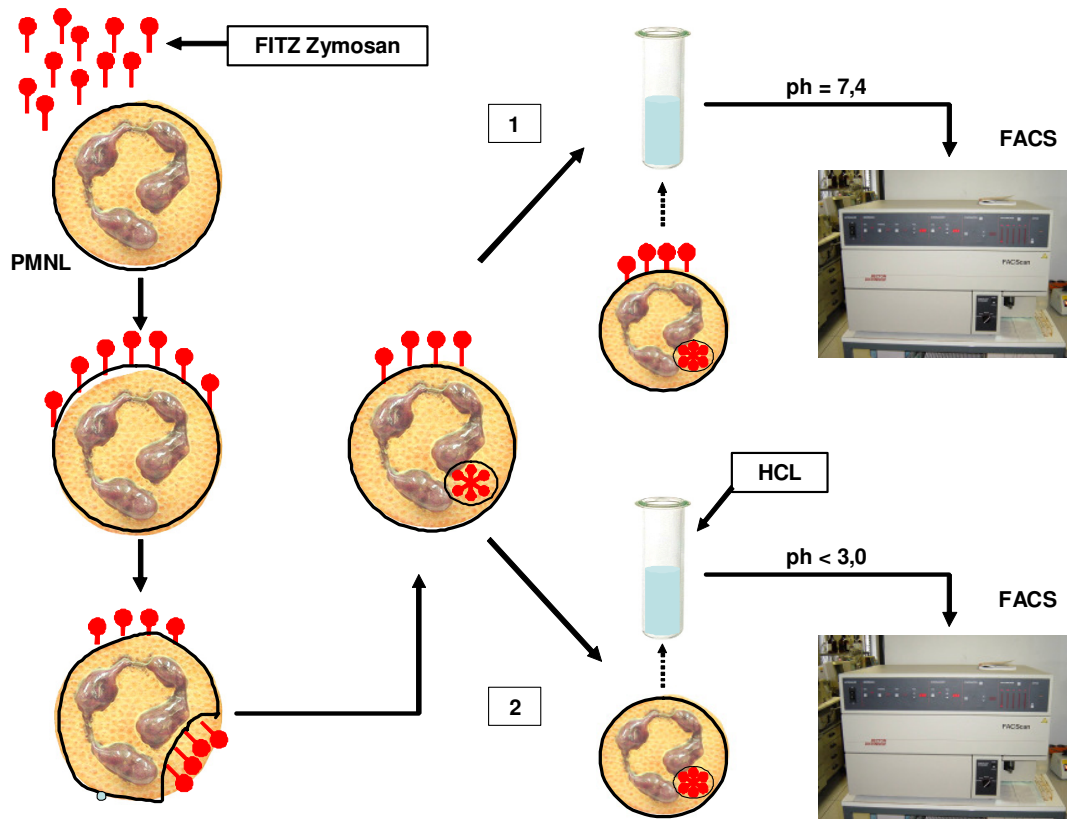


Abb. 9: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung der zymosan- und opsoniert-zymosan-induzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL (Erläuterungen siehe Text)

Die Auswertung erfolgte, nach Identifikation der polymorphkernigen Leukozyten in der SSC/FSC-Graphik, im Fluoreszenzkanal 1.

Der so gewonnene prozentuale Wert ist die Summe des prozentualen Anteils an adhärenzten und phagozytierten Partikeln.

Zur Unterscheidung zwischen Adhärenz und Phagozytose wurden in einem weiteren Schritt nach der *Fluorescence Quenching* Methode die adhärenzten, fluorchromierten Partikel durch azide pH-Wert-Änderung eliminiert [64]. Durch Zugabe von 2M Salzsäure (HCl) im Verhältnis 1:100 wurde dies erreicht und der so entstandene Anteil der phagozytierten Partikel ermittelt (siehe Abbildung 9, ²). Die Adhärenz wurde durch Differenz des Wertes vor und nach der *Fluorescence Quenching* Methode berechnet (siehe Abbildung 9, Prozent ¹ - Prozent ²).

3.2.3 Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL

Die mikrobizide, phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL, sowohl unter Einfluss von Opsonisation als auch ohne Opsonisation, wurde durch Dihydrorhodamin 123 (DHR) nachgewiesen [44]. Wasserstoffperoxid kann durch Oxidation des ungeladenen Indikatorfarbstoffs DHR zu fluoreszierendem Rhodamin sensitiv bestimmt werden [83, 118]. Wegen des elektrisch negativen Potentials der zytoplasmatischen sowie der mitochondrialen Membran akkumuliert das entstandene kationische Rhodamin durch seine Ladung intrazellulär [119]. Der Nachweis der intrazellulären Wasserstoffperoxidproduktion durch DHR ist unabhängig von der Funktion des Enzyms Myeloperoxidase (MPO), da die Oxidation von DHR durch MPO mehr vom Substrat Wasserstoffperoxid als vom Enzym selber abhängt und somit spezifisch ist [142, 145].

Zur Untersuchung des Einflusses der Opsonisation auf die durch Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion wurde Zymosan verwendet, welches mit Plasma vorbehandelt wurde (PTZ). Die Herstellung von PTZ erfolgte analog der unter 3.2.2 beschriebenen Methodik.

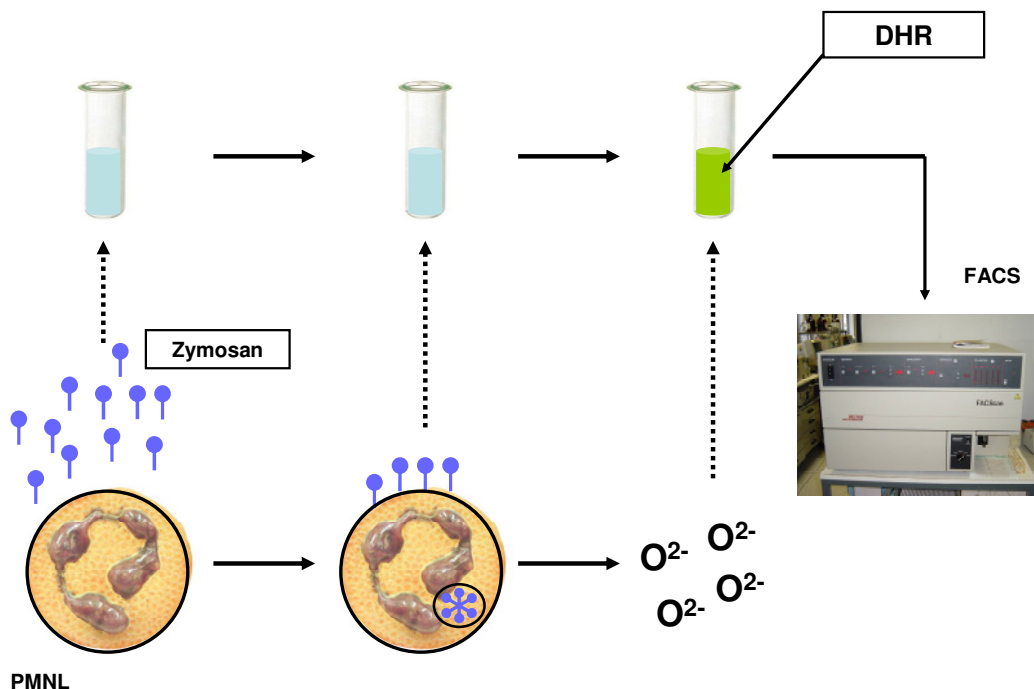


Abb. 10: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung der Phagozytose induzierten Sauerstoffradikalproduktion von PMNL (Erläuterungen siehe Text)

10 µl Leukozyten mit je 5 µl DHR 123 ($c = 1,1 \mu\text{M}$) wurden zusammen für 30 Minuten bei 37°C mit 0,5 ml HBSS und unmarkiertem Zymosan oder mit 0,4 ml HBSS und 100 µl PTZ inkubiert. Abgestorbene Zellen in den Messproben wurden mit 10 µl des DNS-Farbstoffs Propidiumjodid und 20 µl LDS gegengefärbt, um sie vom Signal der vitalen PMNL unterscheiden und in der Analyse exkludieren zu können (siehe auch Inkubationsschema Abbildung 10 und Abschnitt 7.2, Abbildung 37) [119, 138].

Die Auswertung erfolgte, nach Identifikation der polymorphkernigen Leukozyten in der SSC/FSC-Graphik, im Fluoreszenzkanal-1. Da Rhodamin bei 488 nm im grünen Lichtspektrum fluoresziert, wird es mit der Photomultiplieröhre des Fluoreszenzkanal-1 des Durchflußzytometers erfasst.

3.2.4 Spontan und durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion

Sowohl die spontane als auch die durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion wurden in diesem Ansatz untersucht.

Die Zytotoxizität der PMNL wurde dabei durch die Oxidation von Dihydrorhodamin 123 (DHR) zu Rhodamin analog der unter Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Methodik gemessen. Die Stimulation erfolgte dabei rezeptorabhängig als auch rezeptorunabhängig. Als rezeptorabhängige lösliche Stimuli verwendeten wir N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). A23817 (A23), ein Kalziumionophore und Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) dienten als rezeptorunabhängige Stimuli.

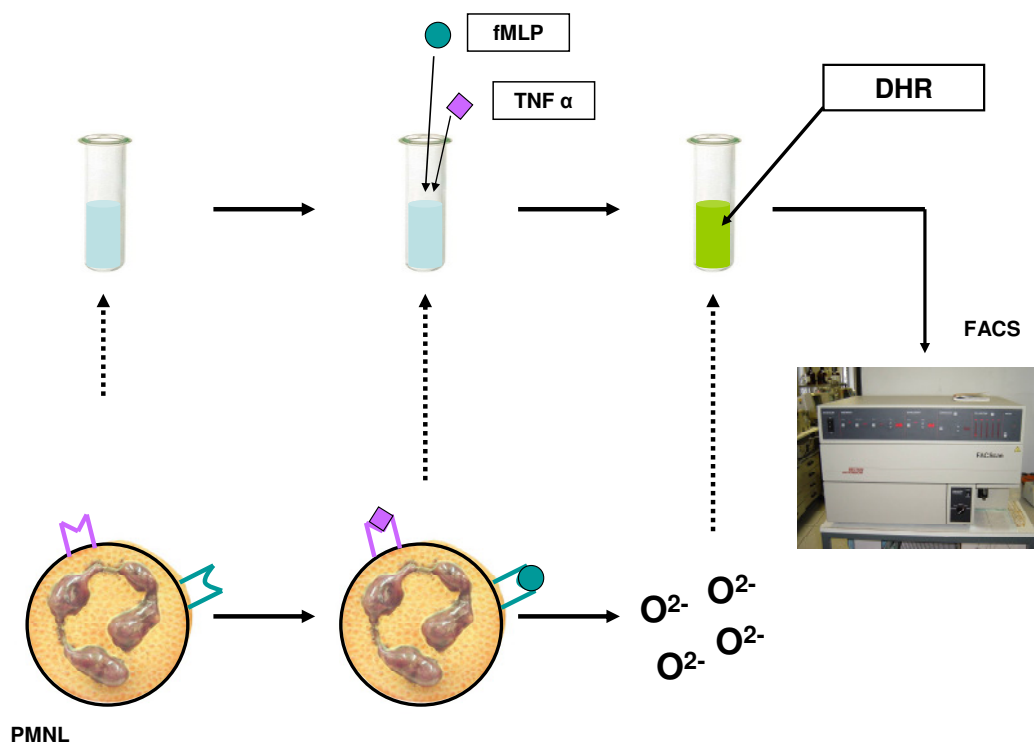


Abb. 11: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung der spontan induzierten zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion von PMNL mittels rezeptorabhängiger Stimulation (Erläuterungen siehe Text)

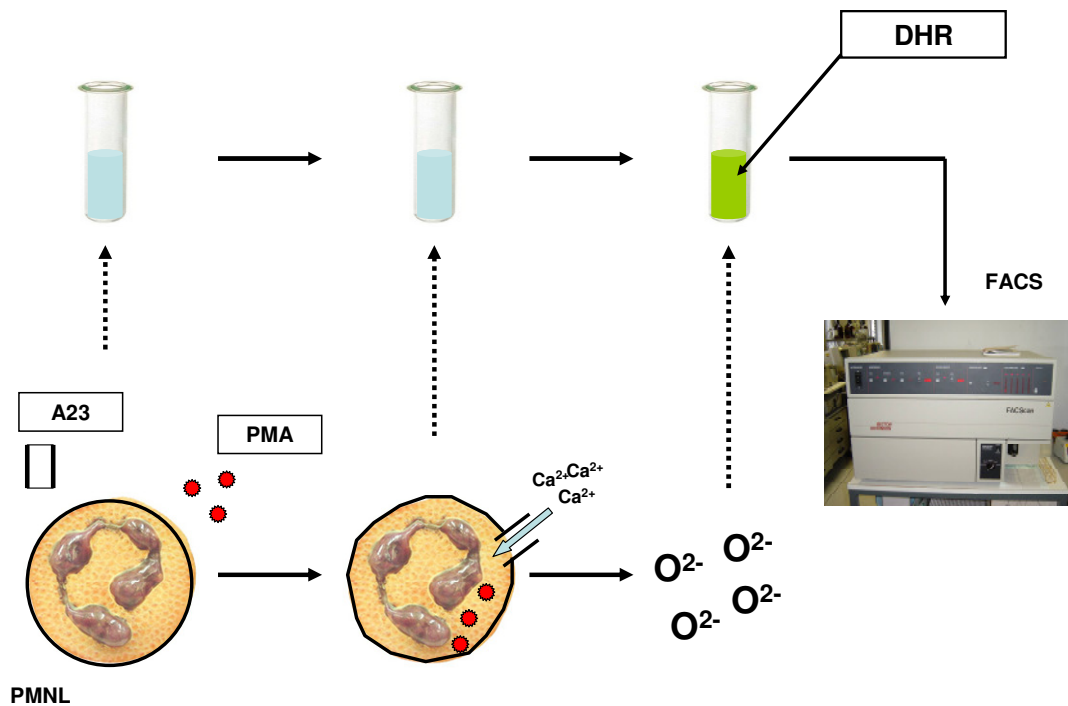


Abb. 12: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung der spontan induzierten zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion von PMNL mittels receptorunabhängiger Stimulation (Erläuterungen siehe Text)

Durch Sedimentation von 3 ml heparinisiertem Vollblut für 45 Minuten auf Histopaque Ficoll-Dichtegradient im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur wurde leukozytenreiches Plasma gewonnen und 750 μl unseparierte Leukozyten abpipetiert.

Der nächste Schritt beinhaltete eine Vorinkubation von fünf Ansätzen im Wärmeblock bei 37°C in 5 ml Polypropylen-Röhrchen mit je 1 ml HBSS sowie 20 μl Leukozyten und 10 μl DHR123 ($c = 1,1 \mu\text{M}$) für zehn Minuten. Der erste Ansatz diente als Kontrolle. Nach fünf Minuten wurden 10 μl $\text{TNF-}\alpha$ ($c = 0,01 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Nach weiteren fünf Minuten wurden zum jeweils entsprechenden Ansatz 10 μl fMLP ($c = 0,1 \mu\text{M}$) oder 50 μl A23 ($c = 0,5 \mu\text{M}$) oder 10 μl PMA ($c = 0,1 \mu\text{M}$) hinzugegeben und für weitere fünfzehn Minuten bei 37°C inkubiert (siehe auch Inkubationsschemata Abbildung 11, 12 und Abschnitt 7.4, Abbildung 38). Anschließend folgte die Trennung der toten Zellen von lebenden Zellen durch Markierung der Proben mit 10 μl Propidiumiodid ($c = 0,3 \mu\text{M}$) und eine Separation mit 20 μl LDS ($c = 0,1 \mu\text{g/ml}$), um diese nach Kühlung auf Eis vermessen zu können.

Die Auswertung erfolgte, nach Identifikation der polymorphkernigen Leukozyten in der SSC/FSC-Graphik, im Fluoreszenzkanal-1.

3.3 Immunologische Parameter des spezifischen Immunsystems

3.3.1 Bestimmung lymphozytärer Subpopulationen anhand des Simultest™ IMK

Der Simultest™ IMK – *Lymphocyte* ist ein Zweifarben-immunfluoreszenz-Reagenzkit, um den Prozentsatz der Lymphozytensubpopulationen in humanem Vollblut zu bestimmen.

Es wurden T-Lymphozyten ($CD3^+$), B-Lymphozyten ($CD19^+$), T-Helfer-Lymphozyten ($CD3^+ CD4^+$), zytotoxische T-Lymphozyten ($CD3^+ CD8^+$) und natürliche Killerzellen ($CD3^- CD16^+$ und/oder $CD56^+$) durch Fluorochrom-markierte Antikörper mittels Durchflußzytometrie unterschieden.

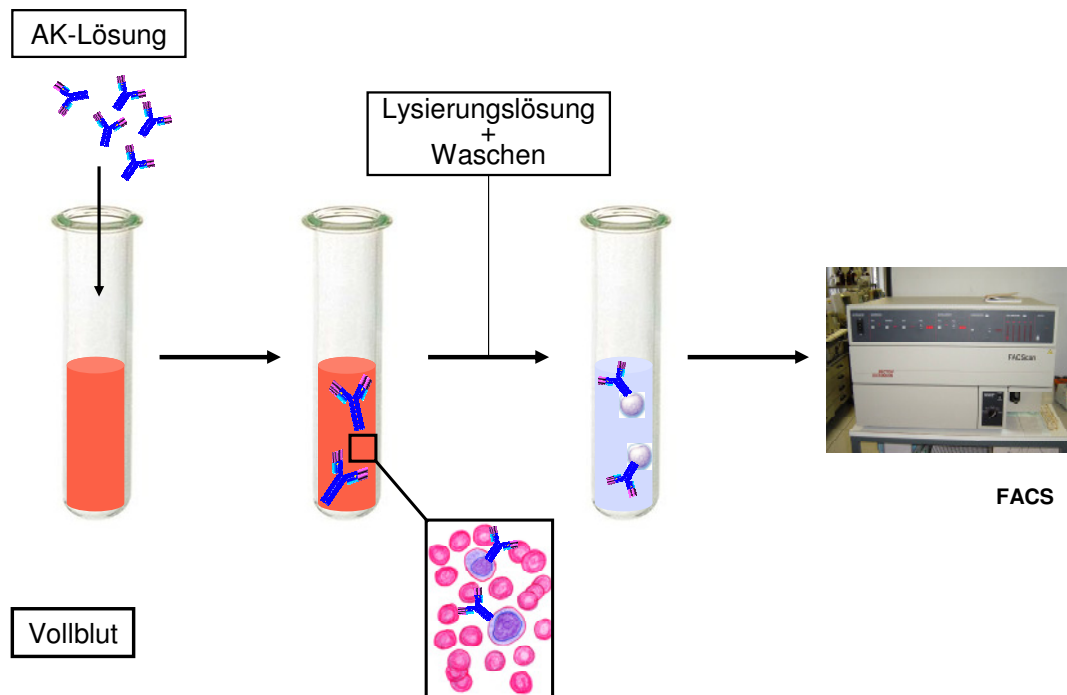


Abb. 13: Schematische Darstellung der Inkubation zur Bestimmung leukozytärer Subpopulationen anhand des Simultest™ IMK (Erläuterungen siehe Text)

Jeweils 50µl EDTA – Vollblut wurden mit 10µl CD45/CD14 (Reagenz A)-, IgG₁{Klon X40}/IgG_{2a}{Klon X39} (Reagenz B)-, CD3/CD19 (Reagenz C)-, CD3/CD4 (Reagenz D)-, CD3/CD8 (Reagenz E)- und CD3/CD16+CD56 (Reagenz F)- Antikörperlösung zwanzig Minuten in 5ml Polypropylen-Röhrchen gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Proben mit Lysierungslösung (IMK-Lyse) zur Elimination der Erythrozyten behandelt. Dem folgte ein Waschvorgang mit HBSS-Lösung und danach eine Zentrifugation für fünf Minuten bei

2500 U/min, um anschließend die so gewonnenen Proben eisgekühlt messen zu können (siehe auch Inkubationsschema Abbildung 13 und Abschnitt 7.5, Abbildung 39).

In der Auswertung lieferte Reagenz A den Gehalt an Leukozyten (CD45) und Monozyten (CD14) sowie eine Differenzierung der Leukozyten in PMNL, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten in der FL-1/FL-2-Graphik (siehe Abbildung 14)

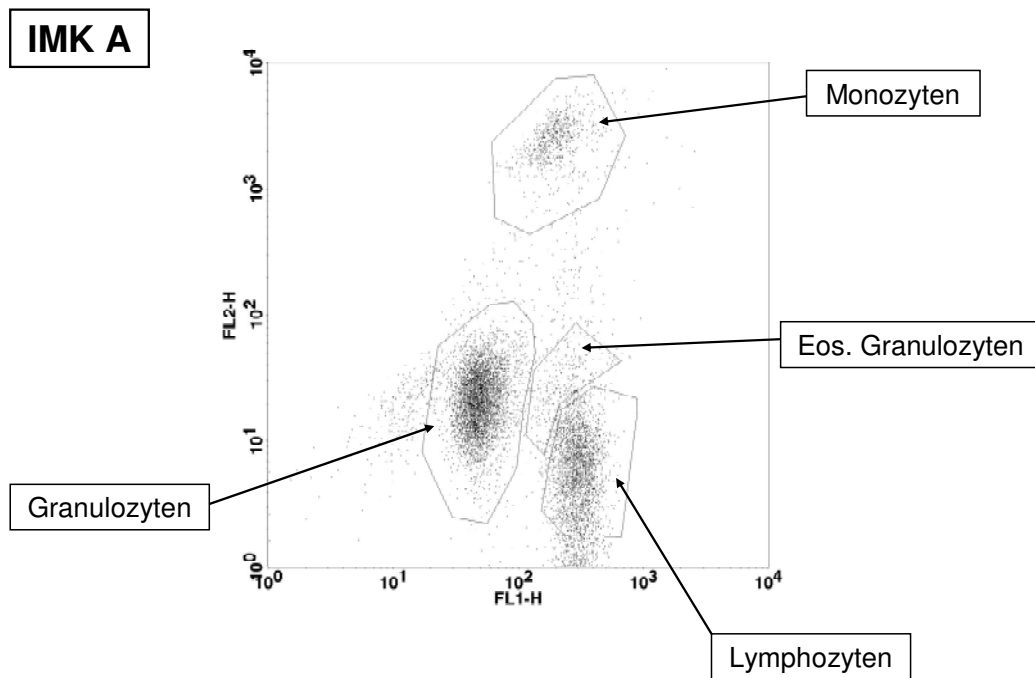


Abb.14: Bestimmung und Identifizierung des Gehalts an Leukozyten und Lymphozyten im Reagenz A des SimultestTM IMK in den Fluoreszenzkanälen FL-1 (CD45) und FL-2 (CD14).

Reagenz B war Kontrollreagenz, um die nichtantigenspezifische Antikörperbindung in der FL1/FL2-Graphik abzuschätzen. Zudem diente es als Marker, um Grenzen für positiv und negativ gefärbte Populationen zu unterscheiden. Durch diese Grenze wurde das Analysenfenster in vier Quadranten aufgeteilt. Der untere linke Quadrant grenzte die unspezifische Antikörperbindung ab. Die verbleibenden drei Quadranten dienten den Reagenzien C – F zur Identifikation der oben beschriebenen Lymphozytensubpopulationen (siehe Abbildung 15).

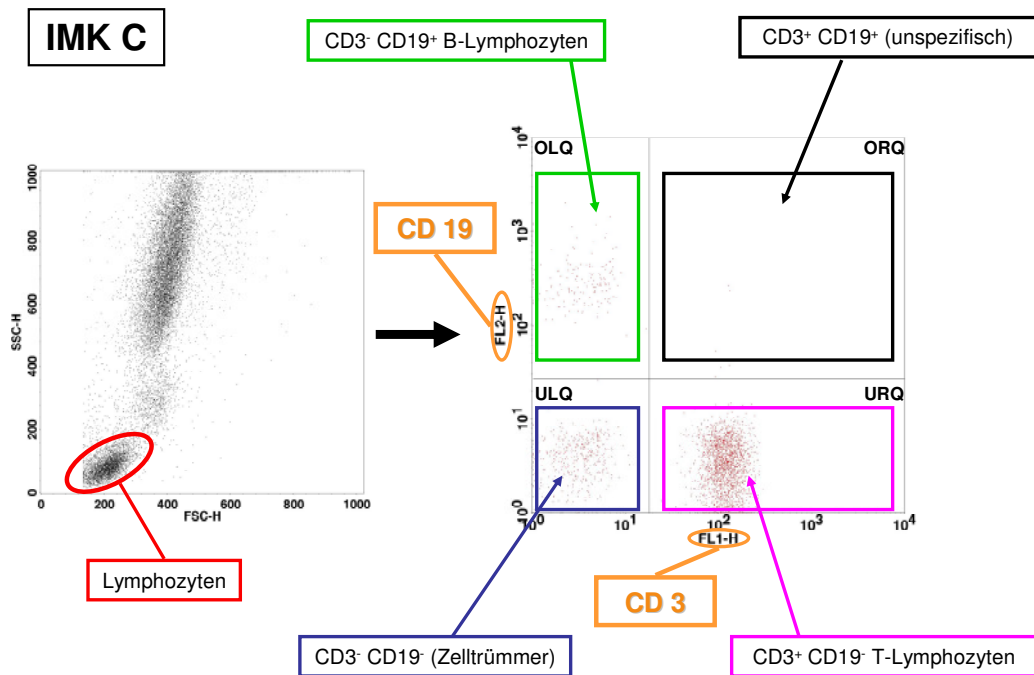


Abb. 15: Bestimmung des Gehalts an Lymphozytensubpopulationen am Beispiel des Reagenz C des Simultest™ IMK. Als erstes Identifizierung und Eingrenzung der Lymphozyten in der SSC/FSC-Graphik. Anschließend wurden die Lymphozyten, die mit CD3-Antikörpern (Fluoreszenzkanal-1) und CD19-Antikörpern (Fluoreszenzkanal-2) markiert wurden, in der FL-2/FL-1-Graphik differenziert. T-Lymphozyten sind CD3 positiv und CD19 negativ und erscheinen im rechten unteren Quadranten. B-Lymphozyten sind CD3 negativ und CD 19 positiv und erscheinen im oberen linken Quadranten.

Es ergaben sich als Resultate prozentuale Werte der Lymphozytensubpopulationen bezogen auf den prozentualen Wert der Lymphozyten.

3.3.2 Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten

Heparinisiertes, antikoaguliertes Vollblut (Heparin: $c_{\text{end}}=10$ IE/ml) wurde mit RPMI 1640 Lösung im Verhältnis 1 zu 1 auf eine Multidish Schale suspendiert. Je ein Ansatz von 1,5 ml mit unstimuliertem und stimuliertem Blut wurde für vier Stunden bei 37 °C und 7% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation des Vollblutes erfolgte mit 11,25 µl PMA ($c_{\text{end}}=0,75$ pM) und 18,75 µl Ionomycin ($c_{\text{end}}=1,25$ µg/ml). Nach einer Stunde wurden jeweils 30µl Brefeldin A (1,4 µmol/L) hinzugefügt.

Nach Entnahme von 9 x 100 µl der Blutproben pro Ansatz, wurden die Zellen für je 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) markierten, monoklonalen T-zellspezifischen Antikörpern (anti-CD3 [$c_{\text{end}}=940$ pg/ml]) sowie mit

monoklonalen T-subzellspezifischen Antikörpern für T-Helferzellen (anti-CD4 [$c_{\text{end}}=300$ pg/ml]) und T-Killerzellen (anti-CD8 [$c_{\text{end}}=470$ pg/ml]) inkubiert. Der nächste Schritt bestand in der Lyse der Erythrozyten mit je 900 μ l *FACSTM-Lysing Solution* für 60 Minuten. Um den Lysevorgang zu stoppen, wurden die Proben folgend zwei Mal mit je 2 ml Washingbuffer (PBS, BSA 0,5%, NaN_3 0,1%) bei 2000 U/min fünf Minuten gewaschen und der Überstand abgesaugt. Nach zehnminütiger Permeabilisierung mit *FACSTM-Permeabilizing Solution* und erneutem analogen, zweimaligen Waschvorgang, wurden die Zellen mit FITC- und PE-markierten monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell-Zytokine (anti-Interferon- γ , anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-10) für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte nach erneutem zweimaligen Waschvorgang die Fixation und Klärung der Zellen mit 500 μ l PFA 1% und 10 μ l Saponin ($c_{\text{end}}=167$ μ g/ml), worauf die Zellen eisgekühlt messbereit waren (siehe auch Inkubationsschema Abbildung 16 und Abschnitt 7.6, Abbildung 40).

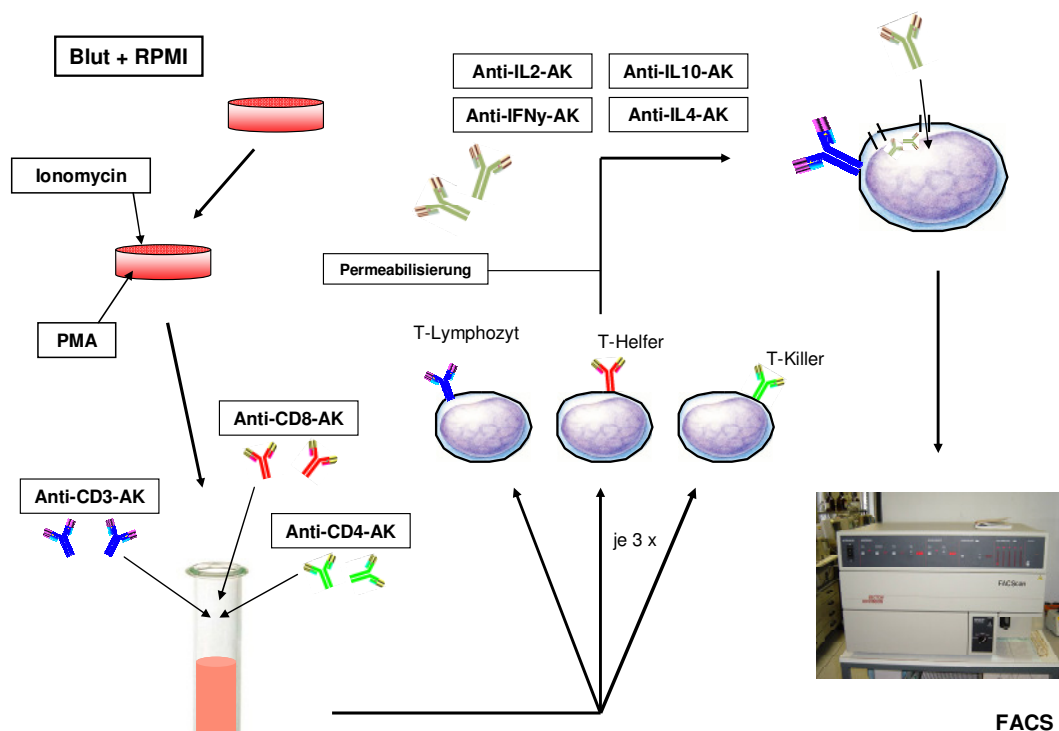


Abb. 16: Schematische Darstellung der Inkubation „Intrazelluläre Zytokinproduktion“ von T-Lymphozyten (Erläuterungen siehe Text)

Für die Analyse der intrazellulären Zytokine wurde ein Kollektiv von insgesamt 10.000 Einheiten während jedes Messvorgangs gezählt. Eine Einheit entspricht dabei einem Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden durch ihre lichtemittierenden Eigenschaften in der

SSC/FSC-Graphik identifiziert. Der Messvorgang war beendet, nachdem durch Setzen eines Markers während der Messung um die Lymphozytenpopulation insgesamt 10.000 Lymphozyten gezählt wurden.

Durch Doppelfärbung der untersuchten Zellen konnten die jeweiligen CD-positiven T-Lymphozytensubpopulationen (CD3, CD4, CD8) in der SSC/FL-3-Graphik unterschieden werden. Anschließend erfolgte die Analyse des Prozentsatzes der Zellen die Interleukin-2 und Interferon- γ produzierten in der SSC/FL-1-Graphik und von Interleukin-4 und Interleukin-10 in der SSC/FL-2-Graphik.

Die spezifische Antwort der Zellen wurde durch die Subtraktion des Prozentsatzes der unstimulierten Proben von den stimulierten Proben ermittelt.

4.0 Ergebnisse

4.1 Klinisches Labor und Patientendaten

Von 20 eingeschlossenen Patienten konnten 19 der statistischen Analyse zugeführt werden. Der Patient Nummer 11 wurde in der Statistik nicht berücksichtigt, da im Rahmen seiner aortokoronaren Bypassoperation zusätzlich eine Mitralklappenrekonstruktion bei hochgradiger Mitralklappeninsuffizienz notwendig wurde.

Durchschnittlich waren die Patienten in dieser Untersuchung 65 Jahre alt. Die Gruppe teilte sich in 12 männliche und 7 weibliche Patienten. Sie hatten einen *Body-Mass-Index* von 25,8 und wiesen damit eine Adipositas Grad I auf (siehe Tabelle 3).

Patienten		x ± SE	n
Geschlecht	männlich		12
	weiblich		7
Alter (Jahre)		65,0 ± 1,4	19
Körpergewicht (kg)		74,7 ± 2,2	19
Körpergröße (cm)		170,1 ± 1,9	19
Body Mass Index (kg/m²)		25,8 ± 0,4	19

Tab. 3: Demographische Daten der untersuchten Patienten; SE: Standardfehler

In der präoperativen OP-Risikoabschätzung nach den aufgestellten Kriterien der American Society of Anesthesiology (ASA) lag der Durchschnitt der Patienten zwischen ASA 3 und ASA 4 (siehe Tabelle 4).

Patienten		x ± SE	n	%
ASA-Klassifikation	3		9	47,4
	4		10	52,6
		3,5 ± 0,1		

Tab. 4: Präoperative Risikoabschätzung nach der ASA-Klassifikation; SE: Standardfehler

Für die in der klinischen Chemie gemessenen Laborparameter Natrium, Kalium, Kalzium, ASAT, ALAT, Kreatinin, Harnstoff, LDH, Albumin, Glukose (kein Nüchternwert) und CRP

hinsichtlich der Organfunktionen ergaben sich zum MZP 1 keine außerhalb der Norm liegenden Werte (Daten nicht gezeigt).

Die Patienten unterzogen sich alle einer myokardialen Revaskularisationsoperation durch Bypassgefäße unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine. Die Dauer für den kardiopulmonalen Bypass des Blutkreislaufs war durchschnittlich 92 Minuten, die Klemmzeit der Aorta 57 Minuten und die Dauer der Reperfusion 30 Minuten. Der Tiefpunkt der Temperatur lag bei 31,8 °C. Durchschnittlich erfolgte die koronare Revaskularisation durch drei Bypassgefäße. Der postoperative Aufenthalt auf der Intensivstation bis zur Verlegung auf die Normalstation betrug 2,5 Tage (siehe Tabelle 5).

Patienten		$\bar{x} \pm SE$	n	%
Herz-Lungen-Bypasszeit (min)		91,7 \pm 3,9	19	
Aortenklammzeit (min)		56,9 \pm 2,6	19	
Reperusionszeit (min)		29,8 \pm 2,3	19	
Minimum CPB Temperatur (°C)		31,8 \pm 0,3	18	
Anzahl der Bypässe	2		2	10,0
	3		14	70,0
	4		4	20,0
Intensivauenthalt (d)		2,5 \pm 0,2	19	

Tab. 5: Dauer der Herz-Lungen-Maschinen-Bypasszeit und des Intensivauenthalts, Anzahl der Bypässe; CPB: kardiupulmonaler Bypass; d: Tage; SE; Standarfehler

Im klinischen Verlauf zeigte sich postoperativ ein im Normbereich gelegener Anstieg der Leukozytenzahl und, gegenüber präoperativ, höhere Werte für Temperatur und Herzfrequenz. Interleukin-6 stieg nach der Operation mit einem Maximum zum Messzeitpunkt 3 an (siehe Tabelle 6).

	MZP 1 (\pm SE)	MZP 2 (\pm SE)	MZP 3 (\pm SE)	MZP 4 (\pm SE)	MZP 5 (\pm SE)
Temperatur [$^{\circ}$C]	36,7 \pm 0,1	36,0 \pm 0,1	37,3 \pm 0,1	37,3 \pm 0,1	37,4 \pm 0,1
HF [min^{-1}]	68 \pm 2	60 \pm 2	89 \pm 2	80 \pm 2	88 \pm 3
Syst. RR [mmHg]	129 \pm 4	98 \pm 4	132 \pm 4	131 \pm 5	136 \pm 4
Diast. RR [mmHg]	74 \pm 2	53 \pm 2	62 \pm 2	61 \pm 3	65 \pm 2
p_aCO₂ [mmHg]		35,7 \pm 0,9	39,4 \pm 1,7	38,2 \pm 0,8	37,0 \pm 0,9
Leukozyten [G/l]	6,6 \pm 0,3	5,0 \pm 0,4	8,9 \pm 0,4	9,5 \pm 0,5	9,7 \pm 0,6
IL-6 [pg/ml]		4,0 \pm 0,5	322 \pm 37	234 \pm 36	158 \pm 24
TNF-α		33,5 \pm 3,5	50,5 \pm 4,9	43,5 \pm 4,7	41,6 \pm 4,6

Tab. 6: Klinische SIRS-Verdachtsparameter im Verlauf: Temperatur (T), Herzfrequenz (HF), systolischer Blutdruck (syst. RR), diastolischer Blutdruck (diast. RR), arterieller CO₂-Gehalt (p_aCO₂) Leukozyten, Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu den Messzeitpunkten 1-5 (MZP1-5) im Vergleich zu MZP1

p<0,05 für T, HF, diast.RR und Leukozyten bei MZP 3-5; p<0,05 für IL-6 bei MZP 2-5; p<0,05 für TNF- α bei MZP 2;

4.2 Parameter der unspezifischen Immunantwort

4.2.1 Bestimmung der Leukozytensubpopulationen in Vollblut:

Durch Anwendung des SimultestTM IMK wurde der Verlauf der Leukozytensubpopulationen zu allen Messzeitpunkten prozentual bestimmt. Anschließend wurde der absolute Gehalt der Zellen der Leukozytensubpopulationen berechnet.

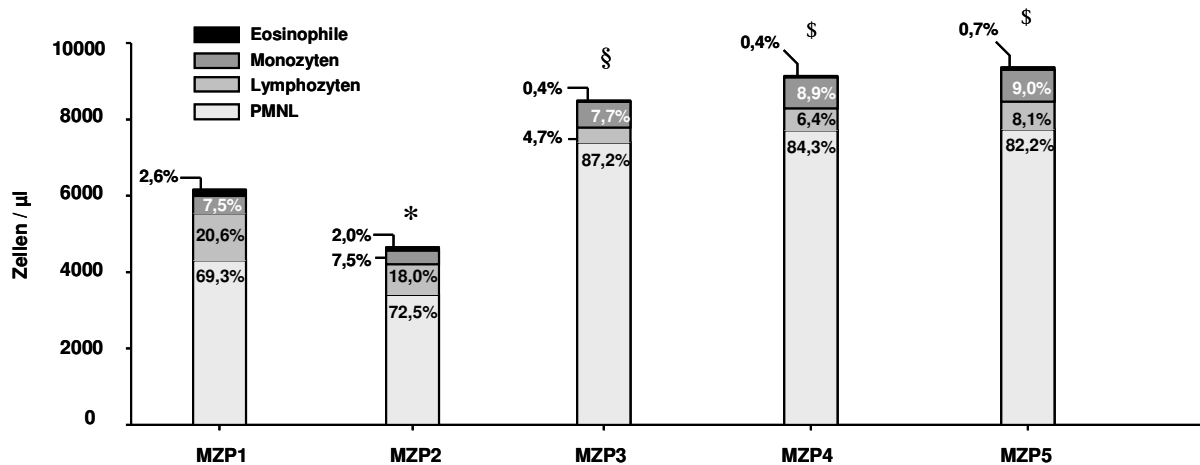


Abb. 17: Verlauf des prozentualen Anteils und des absoluten Gehalts an PMNL, Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten (Eosinophile) präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1 für Lymphozyten und Eosinophile; §: $p < 0,001$ vs. MZIP1 für PMNL, Lymphozyten und Eosinophile; §: $p < 0,001$ vs. MZIP1 für PMNL, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile;

Der prozentuale Anteil sowie der absolute Gehalt an PMNL stieg gegenüber dem Messzeitpunkt 1 ab Messzeitpunkt 3 (sechs Stunden postoperativ) signifikant an und blieb bis zum Messzeitpunkt 5, 48 Stunden postoperativ signifikant erhöht (siehe Abbildung 17, Tabelle 7).

Im Gegensatz dazu fielen sowohl der Prozentsatz als auch der absolute Gehalt an Lymphozyten während der Narkoseeinleitung und sechs Stunden postoperativ signifikant gegenüber den Ausgangswerten ab. Im weiteren Verlauf stiegen sowohl der prozentuale als auch der absolute Wert an Lymphozyten wieder an, blieben allerdings gegenüber den Ausgangswerten signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 17, Tabelle 7).

Monozyten waren im Verlauf der Messungen sowohl in ihrem prozentualen Anteil als auch im absoluten Gehalt ab Messzeitpunkt 4, 24 Stunden postoperativ signifikant gegenüber den Ausgangswerten erhöht (siehe Abbildung 17, Tabelle 7).

Der Verlauf der eosinophilen Granulozyten war dem Verlauf der Lymphozyten ähnlich. Sechs Stunden nach Operation waren sowohl der Gehalt als auch der Prozentsatz signifikant abgefallen (siehe Abbildung 17, Tabelle 7).

Zellen	Messzeitpunkt	MW \pm SEM	Post-hoc Bonferroni Analyse (p Wert vs. MZP1)
PMNL [x 10 ³ Zellen/ μ L]	MZP1	4.3 \pm 0.3	
	MZP2	3.4 \pm 0.3	1.000
	MZP3	7.4 \pm 0.4	0.000
	MZP4	7.7 \pm 0.4	0.000
	MZP5	7.7 \pm 0.5	0.000
Lymphozyten [Zellen/ μ L]	MZP1	1226.2 \pm 55.2	
	MZP2	806.7 \pm 68.1	0.000
	MZP3	394.3 \pm 34.8	0.000
	MZP4	572.2 \pm 69.1	0.000
	MZP5	721.2 \pm 64.5	0.000
Monozyten [Zellen/ μ L]	MZP1	455.3 \pm 32.5	
	MZP2	348.5 \pm 33.2	1.000
	MZP3	663.9 \pm 58.2	0.066
	MZP4	811.9 \pm 62.1	0.000
	MZP5	828.1 \pm 65.0	0.000
Eosinophile Granulozyten [Zellen/ μ L]	MZP1	170.6 \pm 24.0	
	MZP2	92.7 \pm 15.1	0.001
	MZP3	34.6 \pm 6.3	0.000
	MZP4	40.8 \pm 6.6	0.000
	MZP5	69.3 \pm 6.8	0.000

Tab. 7: Mittelwerte (MW) mit Angabe des Standardfehlers (SEM) des absoluten Gehalts an PMNL, Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZP1), während der Narkoseeinleitung (MZP2), 6 Stunden postoperativ (MZP3), 24 Stunden postoperativ (MZP4) und 48 Stunden postoperativ (MZP5); angegeben wurde der p Wert im Vergleich zum Messzeitpunkt 1;

4.2.2 β_2 -Integrine und L-Selektine auf PMNL

Das Oberflächenantigen L-Selektin wurde auf PMNL nach einem initial signifikanten Anstieg während der Narkoseeinleitung, kontinuierlich im Verlauf der Messzeitpunkte weniger exprimiert. Die Reduktion der Expression wurde dabei jeweils 24 sowie 48 Stunden postoperativ signifikant (siehe Abbildung 18).

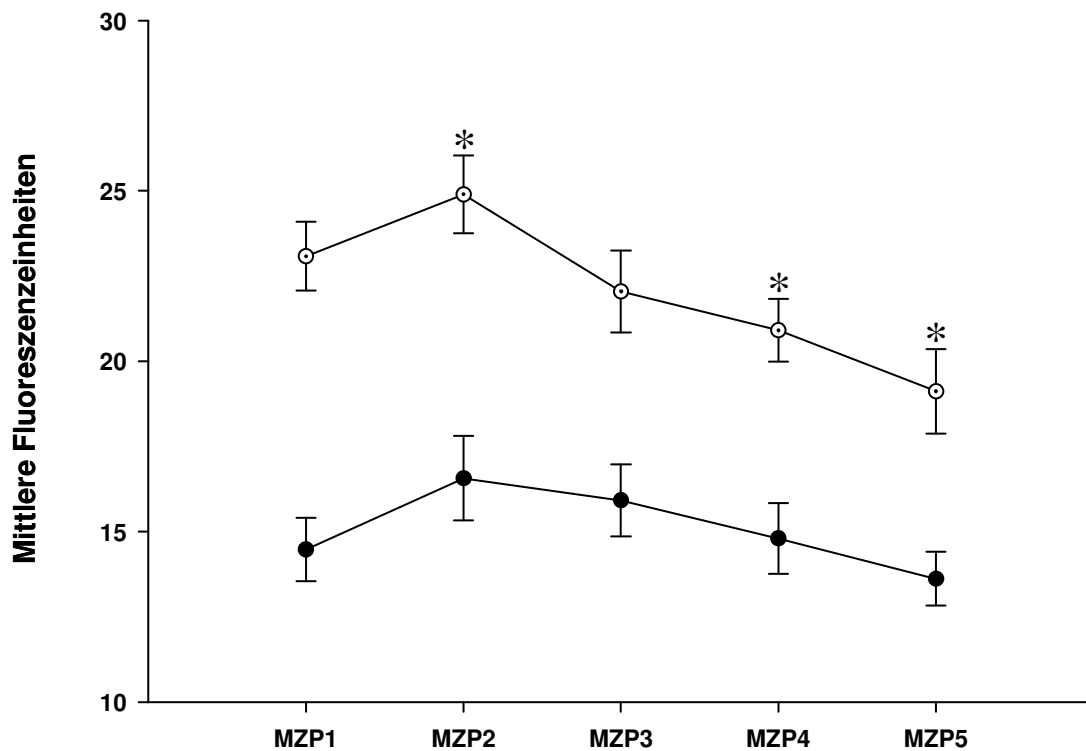


Abb. 18: Verlauf der Expression der Oberflächenantigene L-Selektin (D200) und β_2 -Integrin (IB4) auf PMNL präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; β_2 -Integrin (IB4): [—●—]; L-Selektin (D200): [—○—];

Die Expression der β_2 -Integrine zeigte zwar einen zu L-Selektin vergleichbaren Verlauf. Diese Veränderungen erreichten aber gegenüber den Ausgangswerten oder den Vorwerten kein Signifikanzniveau.

4.2.3 Zymosan- und opsonisations-induzierte Adhärenz und Phagozytosefähigkeit von PMNL

Die Adhärenz von Zymosan an PMNL sank während der Narkoseeinleitung, sowie sechs Stunden nach extrakorporaler Zirkulation signifikant ab. 24 Stunden nach Operation erreichte sie wieder Ausgangsniveau und blieb bis 48 Stunden postoperativ nahezu unverändert.

Hierauf wurde die Phagozytosefähigkeit der PMNL untersucht, die bereits während der Narkoseeinleitung leicht abnahm, aber kein Signifikanzniveau erreichte. Im weiteren Verlauf war die Phagozytosefähigkeit weiter reduziert und wurde zum Messzeitpunkt 3 signifikant. Ab Messzeitpunkt 4, 24 Stunden nach Operation, erholte sich die Phagozytosefähigkeit wieder. Bereits nach 48 Stunden zum Messzeitpunkt 5 hatte sie wieder vergleichbare Werte zum Messzeitpunkt 1 erreicht (siehe Abbildung 19).

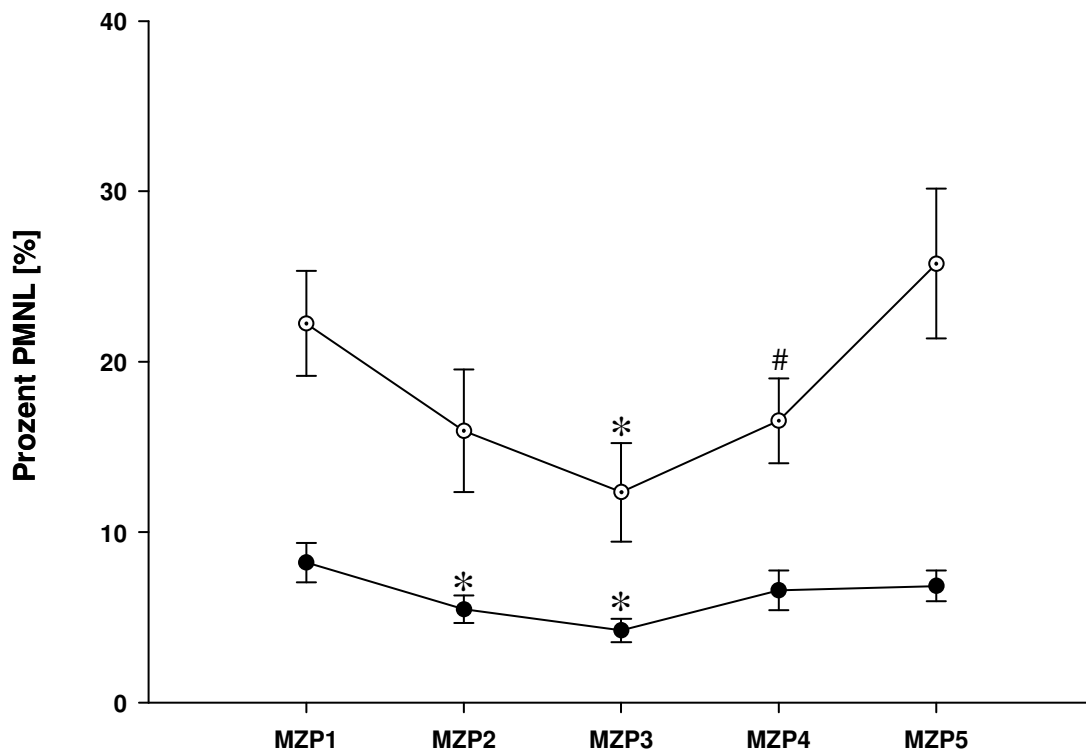


Abb. 19: Verlauf der Zymosaninduzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5); ZYM: Zymosan

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP3; Adhärenz [—●—]; Phagozytose [—○—];

Nach Opsonierung der Zymosanpartikel durch Patientenserum wurde ebenfalls die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL untersucht. Hierbei zeigte sich hinsichtlich der Adhärenz der Partikel ein signifikanter Abfall zum Messzeitpunkt 3. Die so behandelten Zymosanpartikel wurden dennoch nahezu unverändert durch PMNL zu jeder Zeit phagozytiert (siehe Abbildung 20).

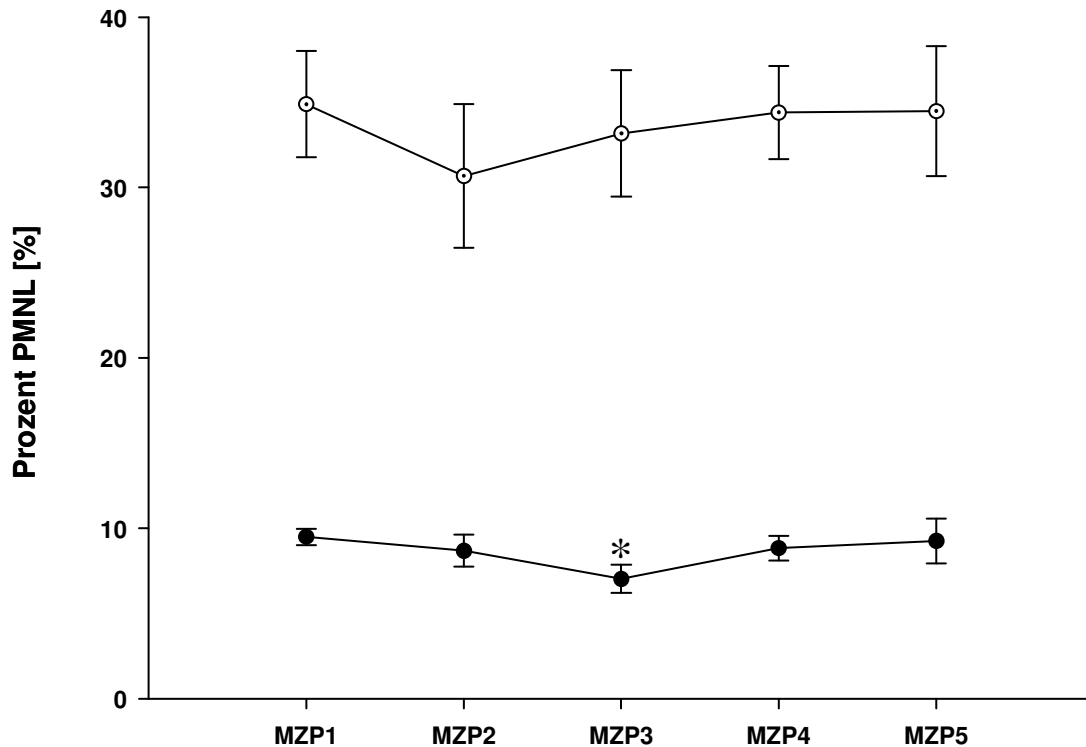


Abb. 20: Verlauf der opsonisations-induzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; Adhärenz [—●—]; Phagozytose [—○—];

Im folgenden Schritt wurde die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von Zymosanpartikeln gemessen, die mittels Kontrollplasma eines gesunden Freiwilligen opsoniert wurden. Für die Adhärenzfähigkeit ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Die ebenso behandelten Partikel wurden mit eigenem Plasma auf höherem Ausgangsniveau phagozytiert. Zum zweiten Messpunkt ergab sich ein signifikanter Abfall. Sechs Stunden postoperativ zum Messzeitpunkt 3 erholte sich die Phagozytosefähigkeit wieder auf Ausgangsniveau. Im weiteren Verlauf ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert oder Vorwerten (siehe Abbildung 21).

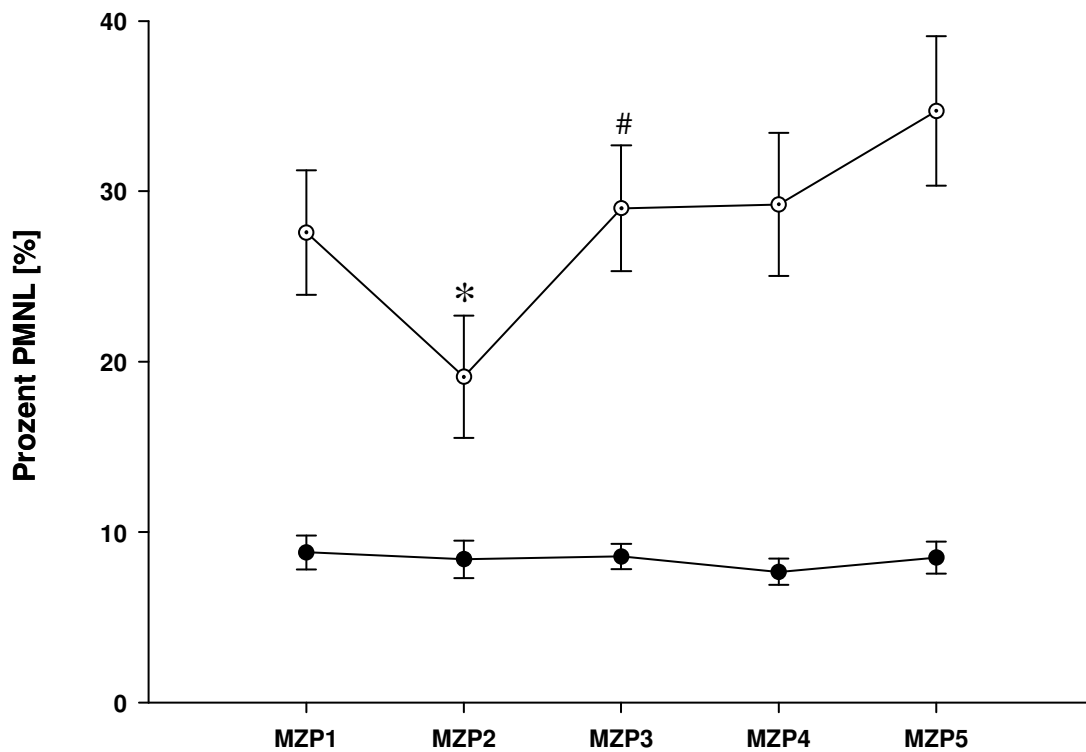


Abb. 21: Verlauf der Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL nach Opsonierung mit Fremdplasma präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP2; Adhärenz [—●—]; Phagozytose [—○—];

4.2.4 Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL

Die durch unbehandeltes Zymosan hervorgerufene Sauerstoffradikalproduktion der PMNL sank in der Narkoseeinleitung signifikant ab. Zum Messzeitpunkt 3 blieb sie insgesamt reduziert. Der Unterschied zu den Ausgangswerten war allerdings nicht signifikant. Zum Messzeitpunkt 4, 24 Stunden nach Operation stieg der Wert wieder auf Ausgangsniveau an. Zum letzten Messzeitpunkt ergaben sich keine Änderungen (siehe Abbildung 22).

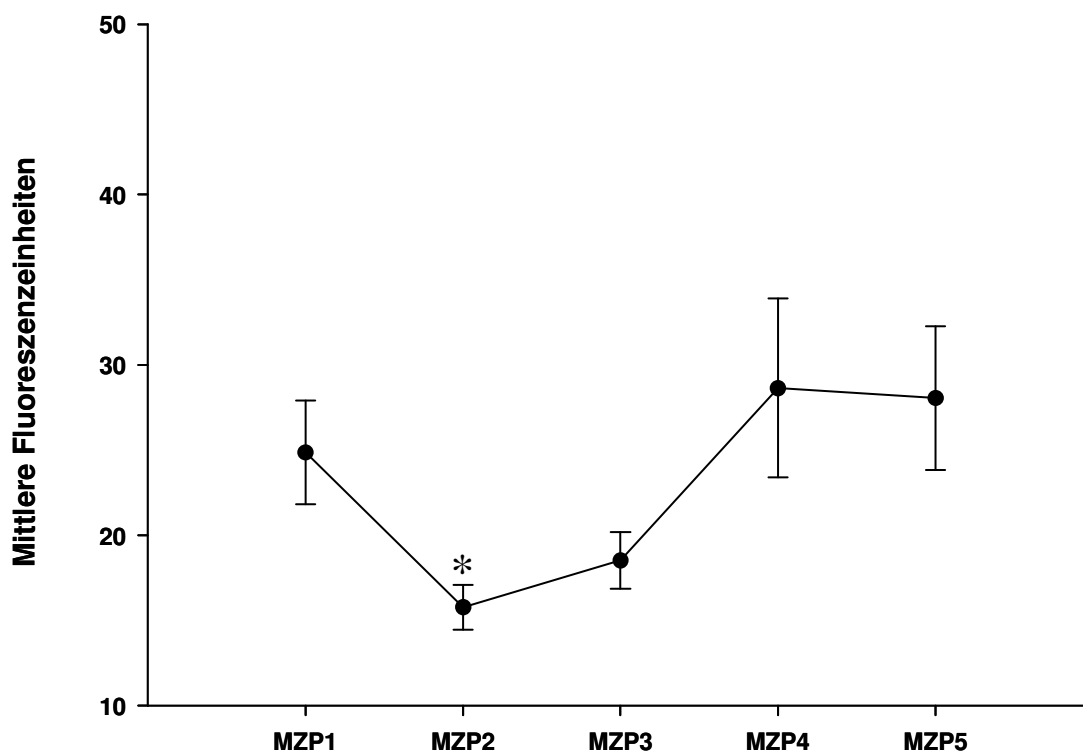


Abb. 22: Verlauf der Phagozytose induzierten Sauerstoffradikalproduktion von PMNL präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1;

Zymosan, welches durch Patientenplasma opsoniert wurde, rief über die Messzeitpunkte 1, 2, 3 und 5 eine relativ gleich bleibende Sauerstoffradikalproduktion hervor. Eine signifikante Erhöhung wurde zum Messzeitpunkt 4, 24 Stunden postoperativ gemessen (siehe Abbildung 23).

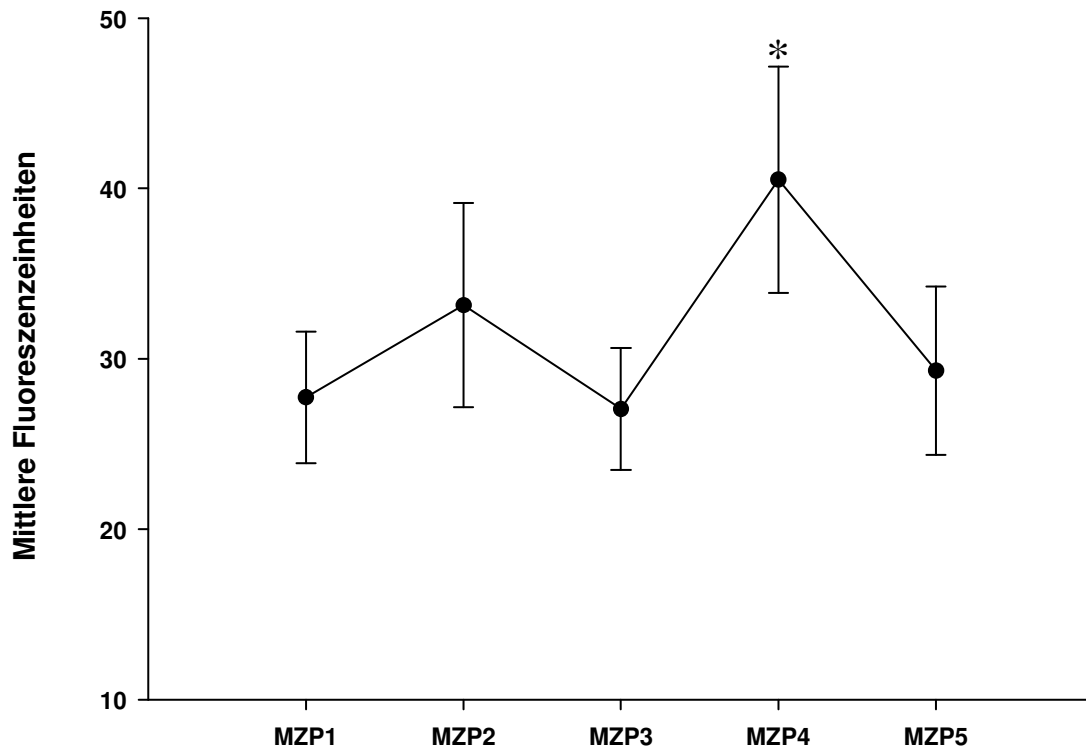


Abb. 23: Verlauf der Phagozytose induzierten Sauerstoffradikalproduktion von PMNL nach Opsonisation präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1;

4.2.5 Spontan und durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion

Die basale Sauerstoffradikalproduktion von PMNL zeigte zu allen Messzeitpunkten keine Veränderung.

PMNL, die rezeptorabhängig durch fMLP stimuliert wurden, zeigten 48 Stunden postoperativ, zum Messzeitpunkt 5 eine signifikant erhöhte Produktion an Sauerstoffradikalen, die sowohl gegenüber dem voran gegangenen Messzeitpunkt und dem Messzeitpunkt 1 signifikant waren. Wurden diese PMNL rezeptorabhängig zusätzlich mit Tumornekrosefaktor- α stimuliert, konnte ein signifikanter Anstieg 48 Stunden zum Messzeitpunkt 5 bestimmt werden (siehe Abbildung 24).

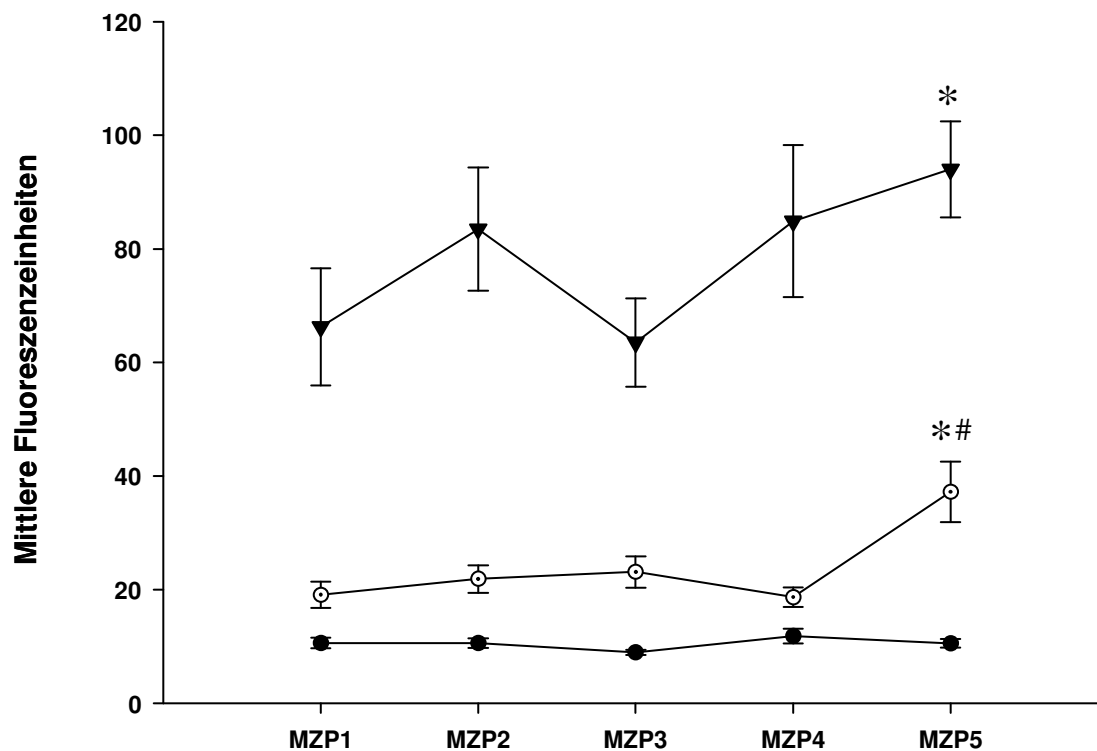


Abb. 24: Verlauf der spontan und durch lösliche, rezeptorabhängige Stimuli induzierten zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion, präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5); DHR: Dihydrorhodamin; K: Kontrolle; fMLP: n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α ;

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP4; K: [—●—]; fMLP: [—○—]; fMLP+TNF: [—▼—];

Die rezeptorunabhängige Stimulation mittels A23187 rief eine geringe Steigerung der Sauerstoffradikalproduktion im Vergleich zu den Ausgangswerten hervor. Signifikanz erreichte diese Erhöhung zum Messzeitpunkt 4, 24 Stunden nach Operation. Bereits 24 Stunden später war diese Erhöhung wieder rückläufig und im Vergleich zu den Ausgangswerten nicht mehr signifikant.

Die durch PMA rezeptorunabhängig stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL sank sechs Stunden postoperativ signifikant ab. Im weiteren Verlauf wurde sie signifikant niedriger und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende der Untersuchungen (siehe Abbildung 25).

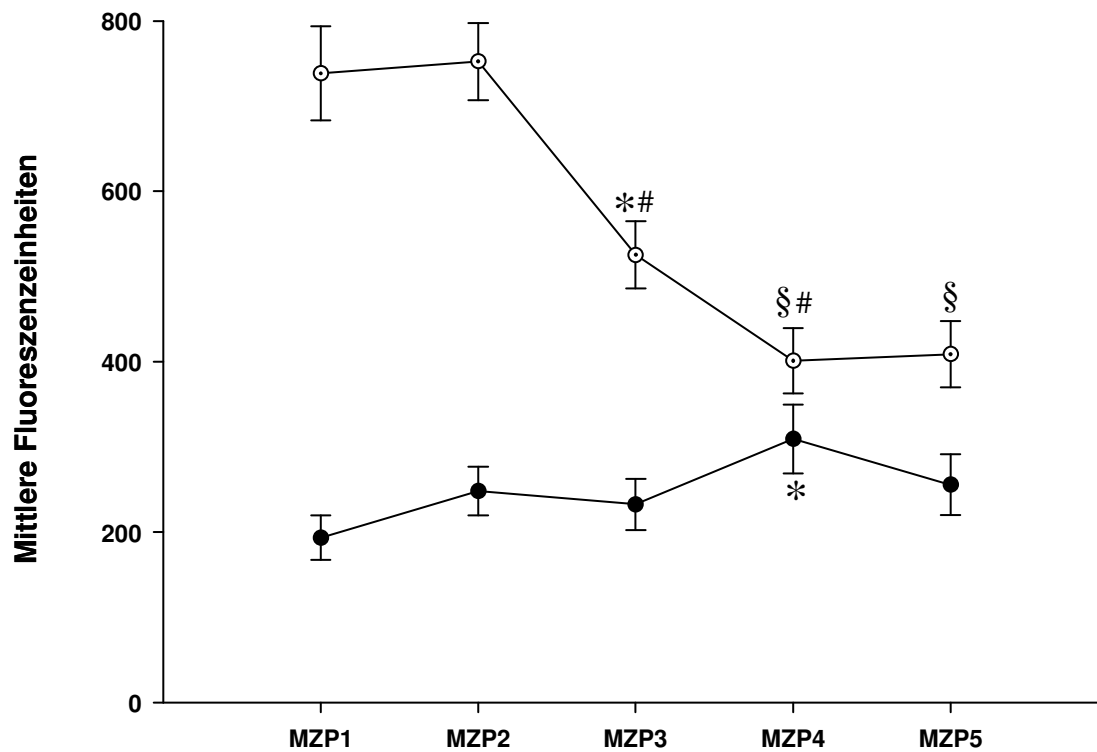


Abb. 25: Verlauf der durch lösliche, rezeptorunabhängige Stimuli induzierten zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5); PMA: Phorbol-myristat-acetat

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; §: $p < 0,001$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP2 bzw. MZIP3; A23: [—●—]; PMA: [—○—];

4.3 Parameter der spezifischen Immunantwort

4.3.1 Bestimmung lymphozytärer Subpopulationen

Im nächsten Schritt wurde der Verlauf der lymphozytären Subpopulationen – B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, T-Helferzellen, T-Killerzellen, Natürliche Killerzellen, CD3 positiv und negativ – untersucht.

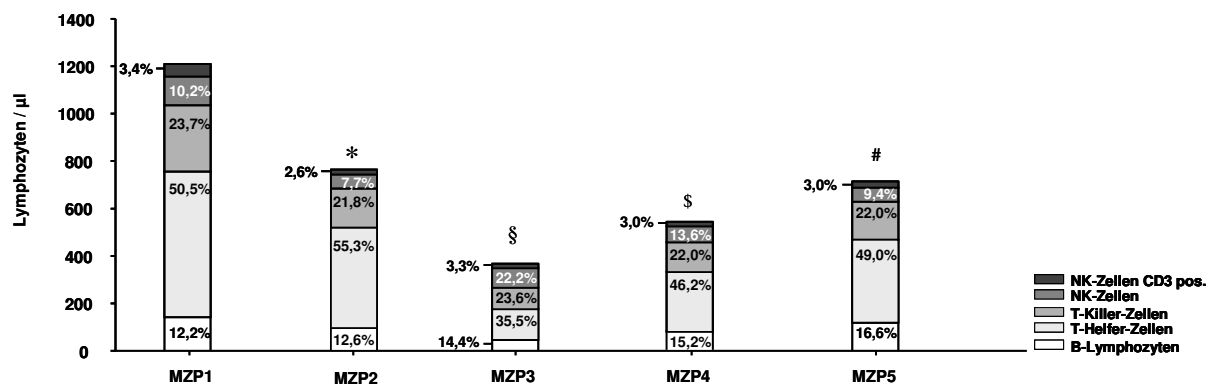


Abb. 26: Verlauf des prozentualen Anteils und des absoluten Gehalts an B-Lymphozyten, T-Helferzellen, T-Killerzellen, CD3 positiv und CD3 negativ Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1 (T-Killerzellen, NK-Zellen CD3 pos.);

§: $p < 0,001$ vs. MZIP1 (T-Lymphozyten, T-Helferzellen, NK-Zellen), $p < 0,05$ vs. MZIP1 (NK-Zellen CD3 pos.)

\$: $p < 0,05$ vs. MZIP1 (B-Lymph., T-Lymph., NK-Z. CD3 p.), $p < 0,001$ vs. MZIP3 (T-Lymph., T-Helferz. NK-Z.)

#: $p < 0,05$ vs. MZIP1 (B-Lymphozyten, NK-Zellen)

Für B-Lymphozyten konnte ein signifikanter Anstieg ab Messzeitpunkt 4 beobachtet werden. Dieser ergab sich als prozentualer Anteil der Lymphozyten (siehe Abbildung 26). Der absolute Gehalt an B-Lymphozyten sank zum Messzeitpunkt 3 und 4 signifikant ab (siehe Tabelle 8). Die Zahl der T-Lymphozyten war zu jedem Messzeitpunkt gegenüber den Ausgangsmessungen niedriger (siehe Tabelle 8). Der prozentuale Anteil von T-Lymphozyten war sechs Stunden postoperativ signifikant reduziert. Zum Messzeitpunkt 4 ergab sich ein signifikanter Anstieg dieser Lymphozytensubpopulation, und die Werte waren auf Niveau der Ausgangswerte zurückgekehrt (siehe Abbildung 26).

Zellen	Messzeitpunkt	MW \pm SEM	Post-hoc Bonferroni Analyse (p Wert vs. MZP1)
B-Lymphozyten (CD19 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	145.3 \pm 13.8	
	MZP2	95.5 \pm 13.5	0.165
	MZP3	49.9 \pm 5.7	0.000
	MZP4	82.5 \pm 12.9	0.027
	MZP5	122.6 \pm 21.1	1.000
T-Lymphozyten (CD3 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	882.2 \pm 42.8	
	MZP2	591.2 \pm 50.9	0.000
	MZP3	210.7 \pm 22.5	0.000
	MZP4	386.5 \pm 51.7	0.000
	MZP5	493.9 \pm 44.2	0.000
T-Helferzellen (CD4 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	613.7 \pm 39.4	
	MZP2	427.0 \pm 42.3	0.003
	MZP3	128.7 \pm 14.7	0.000
	MZP4	253.5 \pm 34.8	0.000
	MZP5	349.6 \pm 36.0	0.000
T-Killerzellen (CD8 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	279.8 \pm 22.3	
	MZP2	164.7 \pm 17.4	0.001
	MZP3	90.9 \pm 14.1	0.000
	MZP4	124.5 \pm 23.2	0.000
	MZP5	160.1 \pm 21.6	0.001
Natürliche Killerzellen (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	120.9 \pm 16.5	
	MZP2	59.2 \pm 8.9	0.001
	MZP3	81.0 \pm 11.5	0.109
	MZP4	68.5 \pm 7.9	0.010
	MZP5	59.7 \pm 6.9	0.001
CD3⁺positive Natürliche Killerzellen (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) [Zellen/ μ L]	MZP1	52.0 \pm 10.3	
	MZP2	20.4 \pm 4.2	0.003
	MZP3	19.4 \pm 4.5	0.002
	MZP4	18.9 \pm 3.6	0.002
	MZP5	25.6 \pm 4.7	0.022

Tab. 8: Mittelwerte (MW) mit Angabe des Standardfehlers (SEM) des absoluten Gehalts an B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, T-Helferzellen, T-Killerzellen, Natürlichen Killerzellen und CD3 positiven Natürlichen Killerzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZP1), während der Narkoseeinleitung (MZP2), 6 Stunden postoperativ (MZP3), 24 Stunden postoperativ (MZP4) und 48 Stunden postoperativ (MZP5); angegeben wurde der p Wert im Vergleich zum Messzeitpunkt 1;

Der Gehalt an T-Helferzellen und T-Killerzellen war zu jedem Messzeitpunkt gegenüber den Ausgangsmessungen signifikant reduziert. Der niedrigste Wert wurde für beide T-Lymphozytensubpopulationen zum Messzeitpunkt 3, sechs Stunden postoperativ gemessen (siehe Tabelle 8). Diese Reduktion zeigte sich bei T-Killerzellen im prozentualen Anteil der gesamten Lymphozyten nur zum Messzeitpunkt 2. Die folgenden Messzeitpunkte ergaben einen gleichbleibenden prozentualen Anteil der T-Killerzellen (siehe Abbildung 26). Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen war zum Messzeitpunkt 3 und 4 signifikant reduziert. Zum letzten Messzeitpunkt war der Prozentsatz wieder mit den Ausgangswerten vergleichbar. (siehe Abbildung 26).

Der absolute Gehalt an CD3 positiven und CD3 negativen natürlichen Killerzellen war zu jedem Messzeitpunkt gegenüber der ersten Messung signifikant reduziert (siehe Tabelle 8). Der prozentuale Anteil der CD3 negativen natürlichen Killerzellen zu den gesamten Lymphozyten war hingegen zum Messzeitpunkt 3 signifikant erhöht. Die folgenden Messzeitpunkte ergaben eine Abnahme des prozentualen Anteils gegenüber dem Messzeitpunkt 3, sechs Stunden postoperativ. Der Prozentsatz der CD3 positiven natürlichen Killerzellen zu den gesamten Lymphozyten war zu den Messzeitpunkten 2 und 4 signifikant niedriger. Zum dritten Messzeitpunkt konnte dagegen ein signifikant höherer Anteil der CD3 positiven natürlichen Killerzellen an den gesamten Lymphozyten bestimmt werden (siehe Abbildung 26)

4.3.2 Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten

Der prozentuale Anteil an Interleukin-2 produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten zeigte einen signifikanten Abfall sechs Stunden nach Operationsende zum Messzeitpunkt 3 verglichen mit den Ausgangswerten und verglichen mit dem Vorwert zum Messzeitpunkt 2. 24 und 48 Stunden postoperativ hatte der Anteil an Interleukin-2 produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten wieder Ausgangswerte erreicht (siehe Abbildung 27).

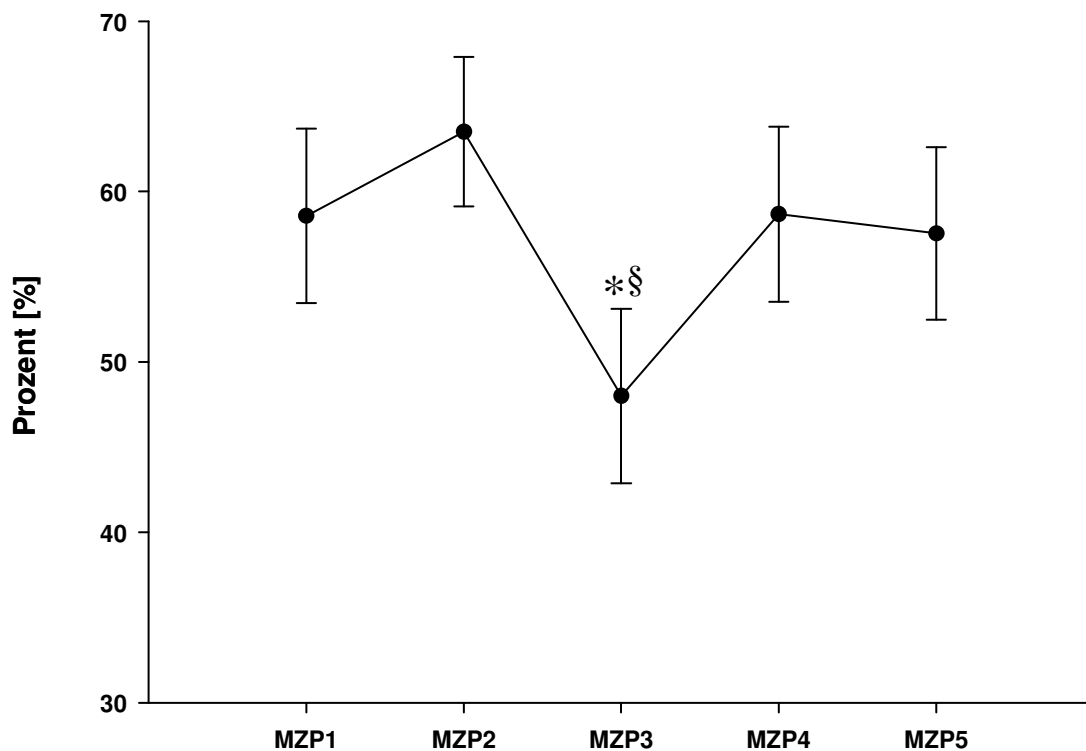


Abb. 27: Verlauf des Anteils an Interleukin-2 (IL2) produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; §: $p < 0,001$ vs. MZIP2

Der Abfall des Anteils von Interleukin-2 produzierenden, CD4 positiven T-Helferzellen konnte ebenso wie bei den CD3 positiven T-Lymphozyten sechs Stunden postoperativ zum Messzeitpunkt 3 gemessen werden. Auch hier wurden bereits 24 und 48 Stunden postoperativ Ausgangswerte bestimmt, wobei die Werte zum Messzeitpunkt 4 signifikant gegenüber dem Vorwert anstiegen (siehe Abbildung 28).

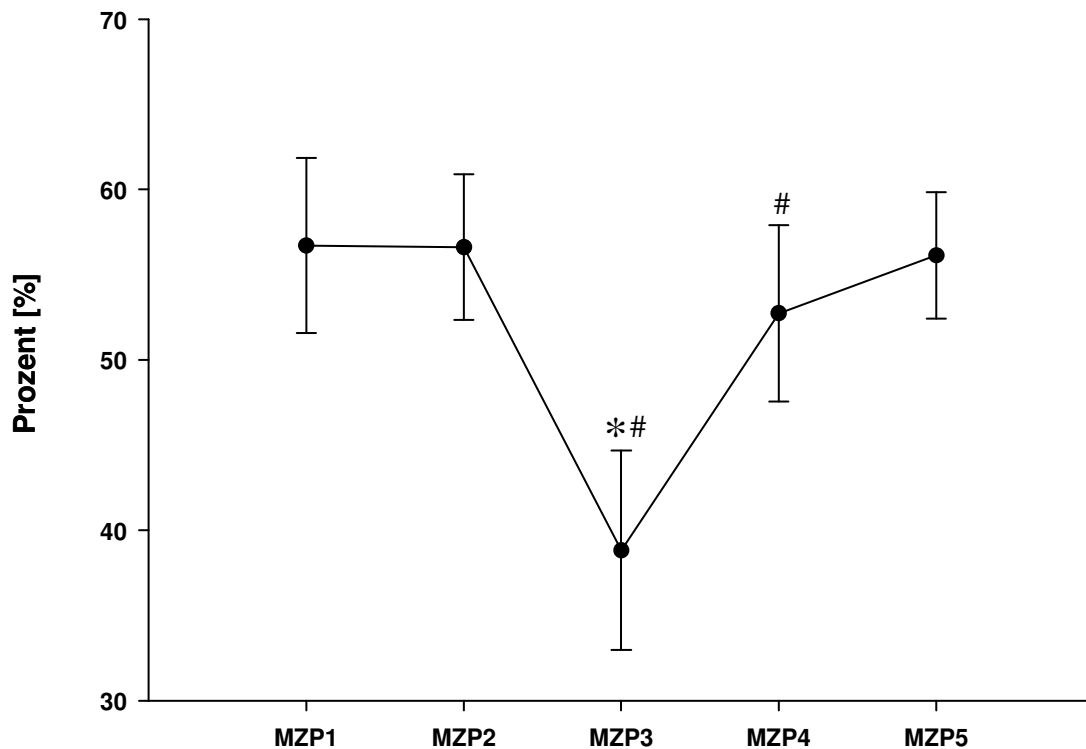


Abb. 28: Verlauf des Anteils an Interleukin-2 (IL2) produzierenden, CD4 positiven T-Helferzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP3;

Beim Anteil der Interleukin-2 produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen wurde ein Abfall sechs Stunden postoperativ zum Messzeitpunkt 3 gemessen. Dieser war gegenüber dem Vorwert hoch signifikant unterschiedlich, zeigte jedoch gegenüber den Ausgangswerten keine Veränderung. Der Anteil an Interleukin-2 produzierenden CD8 positiven T-Killerzellen war dagegen bereits signifikant gegenüber den Ausgangswerten in der Einleitungsphase der Narkose erhöht. 24 Stunden als auch 48 Stunden postoperativ war der Prozentsatz Interleukin-2 produzierender, CD8 positiver T-Killerzellen ebenso wie bei CD3 und CD4 positiven, Interleukin-2 produzierenden T-Lymphozyten auf Ausgangsniveau zurück gekehrt (siehe Abbildung 29).

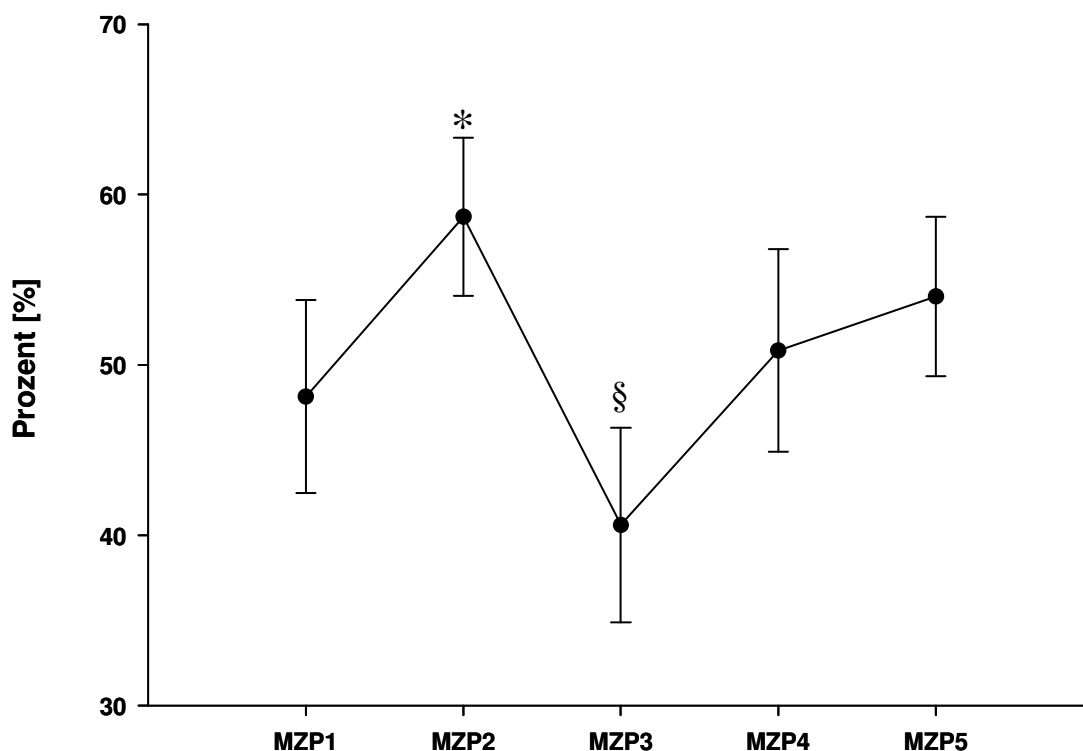


Abb. 29: Verlauf des Anteils an Interleukin-2 (IL2) produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,001$ vs. MZIP2

Für den Anteil an Interferon- γ produzierenden CD3 positiven T-Lymphozyten, CD4 positiven T-Helferzellen sowie CD8 positiven T-Killerzellen konnten im Gesamtverlauf aller Messungen keine signifikanten Unterschiede gemessen werden (Graphen nicht dargestellt).

Der Prozentsatz an Interleukin-4 produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten stieg sechs Stunden nach Operationsende zum Messzeitpunkt 3 signifikant gegenüber den Ausgangswerten an. Im weiteren Verlauf der Messungen blieb dieser Wert sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Operationsende signifikant erhöht (siehe Abbildung 30).

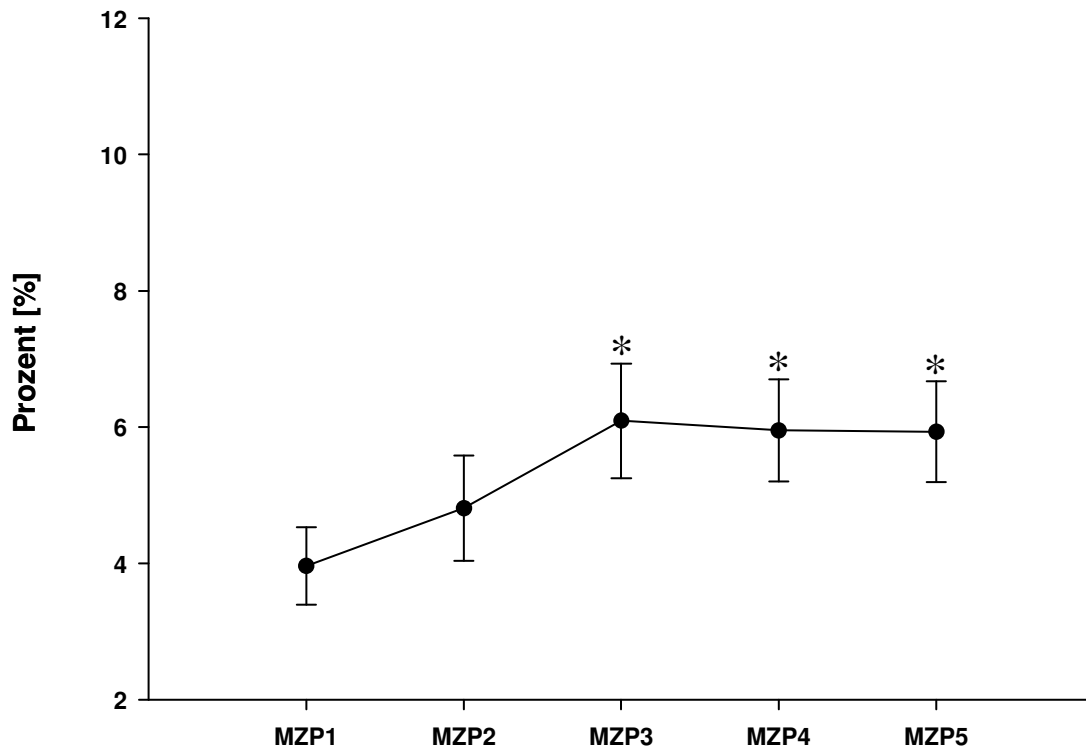


Abb. 30: Verlauf des Anteils an Interleukin-4 (IL4) produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1

Die postoperative Erhöhung des Anteils von Interleukin-4 produzierenden, CD4 positiven T-Helferzellen konnte im Verlauf gezeigt werden, erreichte allerdings kein signifikantes Niveau (Daten nicht gezeigt).

Für den Anteil der Interleukin-4 produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen wurde ebenfalls ein postoperativer Anstieg gemessen. Zum letzten Messzeitpunkt, 48 Stunden postoperativ wurde diese Erhöhung gegenüber den Ausgangswerten hoch signifikant (siehe Abbildung 31).

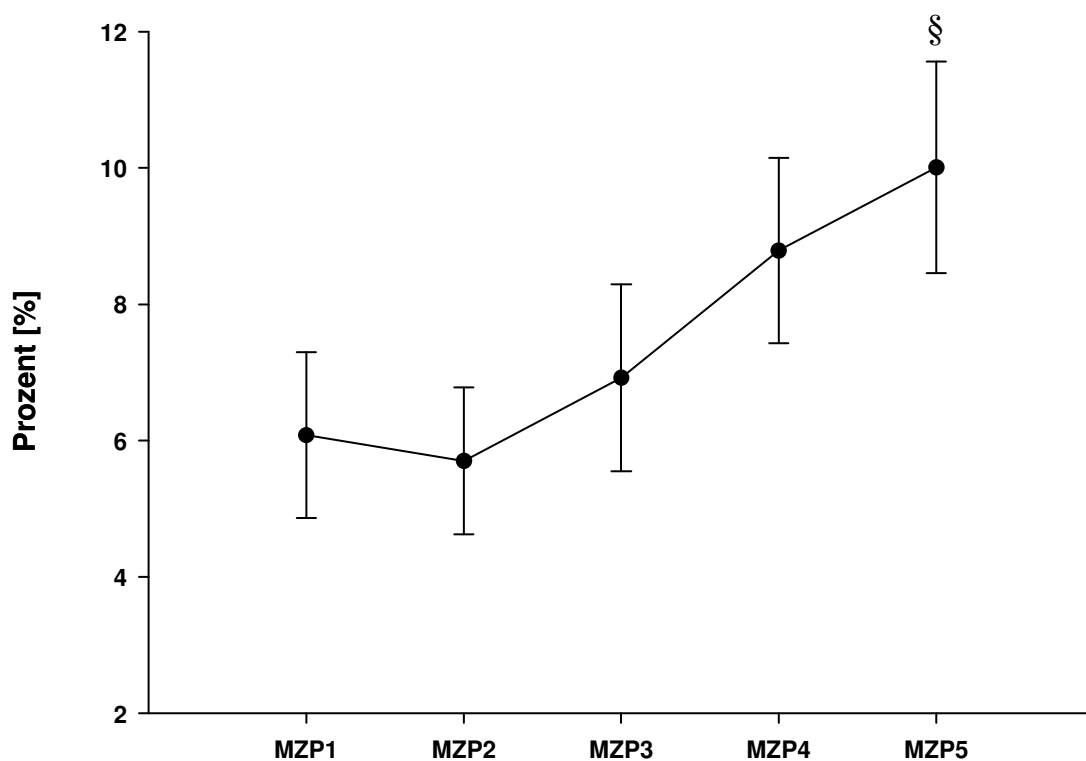


Abb. 31: Verlauf des Anteils an Interleukin-4 (IL4) produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);
§: $p < 0,001$ vs. MZIP1

Der Anteil an Interleukin-10 produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten stieg sechs Stunden postoperativ signifikant gegenüber den Ausgangswerten an. Der Vergleich mit den Vorwerten zum Messzeitpunkt 2 zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung. Auch 24 Stunden postoperativ war der Prozentsatz Interleukin-10 produzierender, CD3 positiver T-Lymphozyten durch dieses erhöhte Niveau gekennzeichnet. Zum letzten Messzeitpunkt, 48 Stunden postoperativ, fiel der Anteil Interleukin-10 produzierender T-Lymphozyten signifikant gegenüber den Vorwerten ab, blieb aber weiterhin, im Vergleich zu den Ausgangswerten, signifikant erhöht (siehe Abbildung 32).

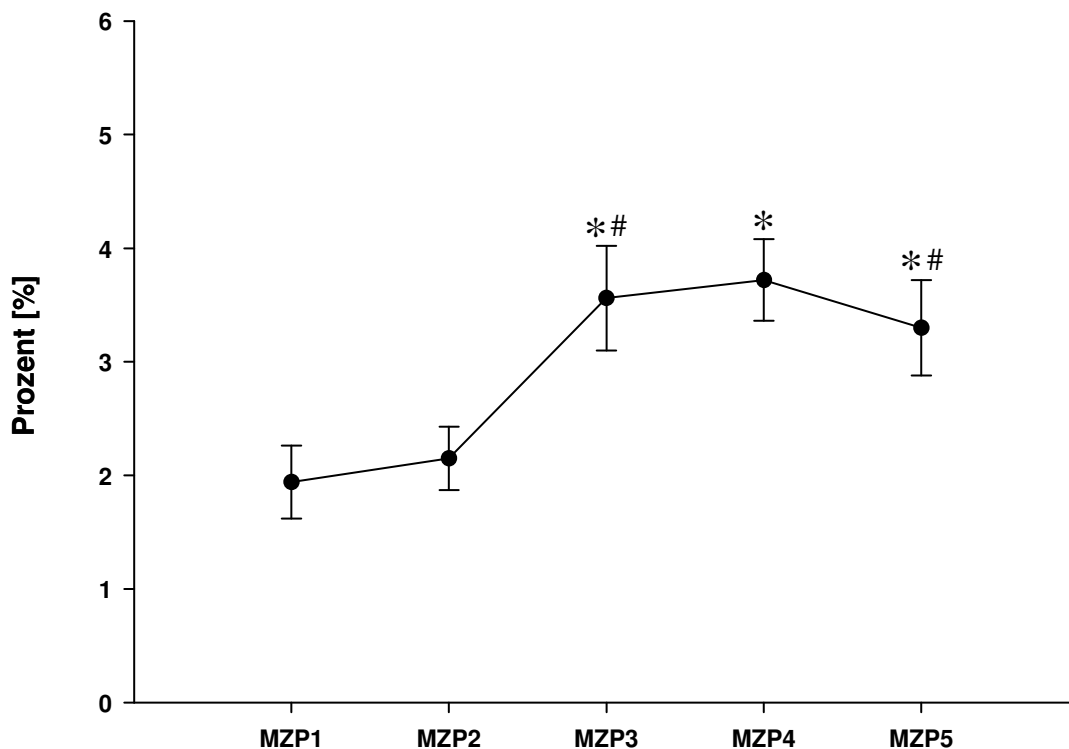


Abb. 32: Verlauf des Anteils an Interleukin-10 (IL10) produzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);

*: $p < 0,05$ vs. MZIP1; #: $p < 0,05$ vs. MZIP2 bzw. MZIP4

Bei dem Anteil der Interleukin-10 produzierenden, CD 4 positiven T-Helferzellen konnte ebenfalls ein Anstieg gezeigt werden. Ein hoch signifikantes Niveau wurde dabei 24 und 48 Stunden nach Operationsende zu den Messzeitpunkten 4 und 5 erreicht (siehe Abbildung 33).

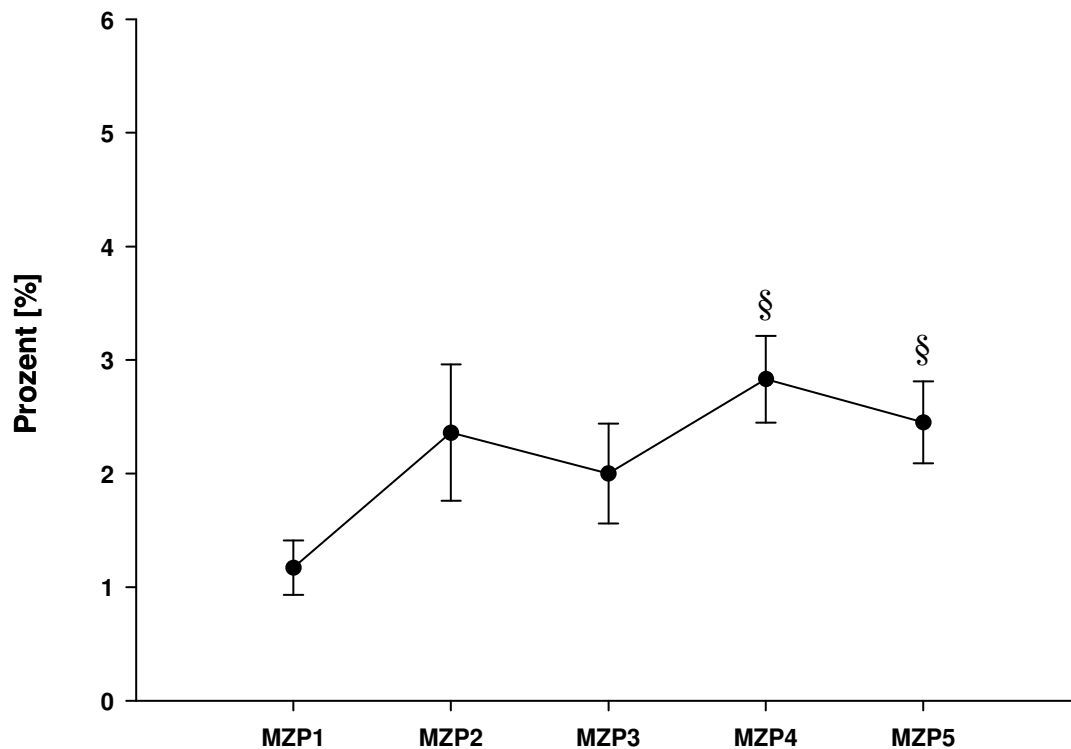


Abb. 33: Verlauf des Anteils an Interleukin-10 (IL10) produzierenden, CD4 positiven T-Helferzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);
§: $p < 0,001$ vs. MZIP1

Die Bestimmung des Anteils der Interleukin-10 produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen ergab sowohl sechs Stunden, 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Operationsende eine signifikante Erhöhung gegenüber den Ausgangswerten (siehe Abbildung 34).

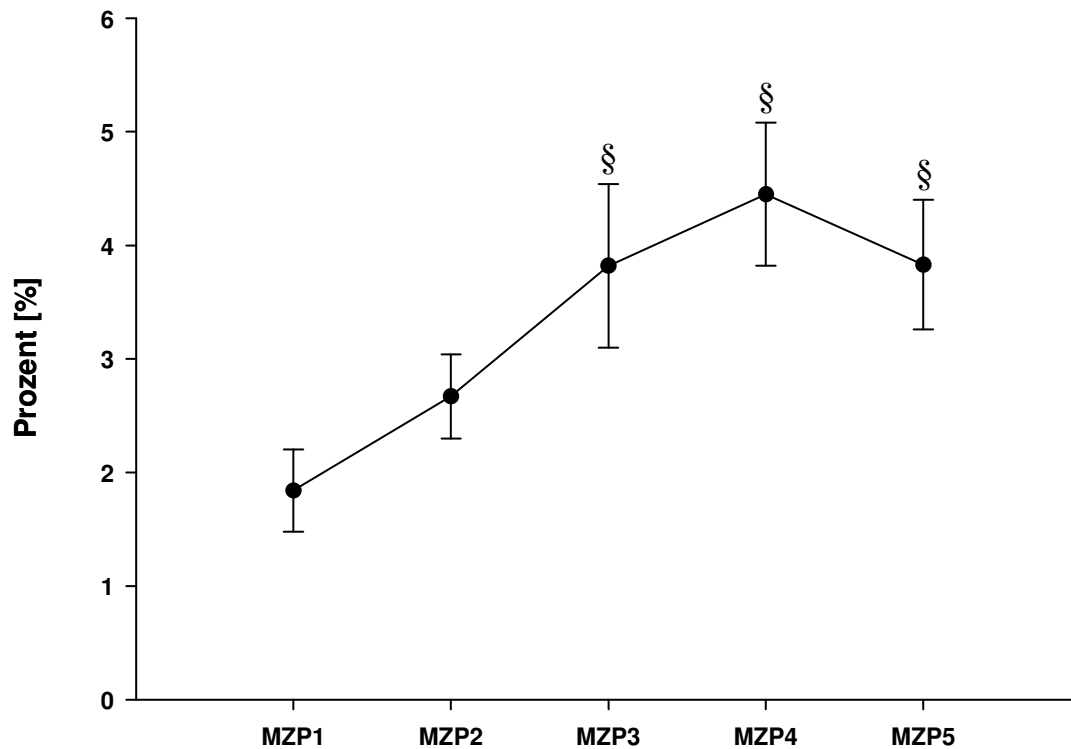


Abb. 34: Verlauf des Anteils an Interleukin-10 (IL10) produzierenden, CD8 positiven T-Killerzellen präoperativ (Messzeitpunkt 1 / MZIP1), während der Narkoseeinleitung (MZIP2), 6 Stunden postoperativ (MZIP3), 24 Stunden postoperativ (MZIP4) und 48 Stunden postoperativ (MZIP5);
§: $p < 0,001$ vs. MZIP1

5.0 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses durch Einsatz der Herz-Lungen-Maschine simultan auf das unspezifische und spezifische Immunsystem zu untersuchen. In der Literatur gibt es eine Reihe von Arbeiten, die Teilaspekte der inflammatorischen Antwort nach extrakorporaler Zirkulation aufklären. Fest steht, dass die Entwicklung von Organdysfunktionen nach herzchirurgischen Eingriffen trotz der fortschrittlichen Entwicklung im Hinblick auf medikamentöse Therapie, eine adäquate Volumentherapie oder Einsatz von weiteren organspezifischen, supportiven Therapiestrategien den postoperativen Verlauf bestimmen. Die Organdysfunktion wird dabei zum einen durch anhaltende Hypoperfusion, zum anderen aber wesentlich durch eine gesteigerte Inflammation getriggert. Die Faktoren, die dabei das Zusammenspiel zwischen humoralen und zellulären Bestandteilen der Inflammation steuern und die so das Ausmaß der inflammatorischen Antwort beeinflussen, sind bis heute nicht geklärt [89]. Die Analyse von kleinen Patientenkollektiven und die selektive Untersuchung von Teilaspekten der immunologischen Reaktion nach herzchirurgischen Eingriffen ergibt gerade auf dem Gebiet des spezifischen Immunsystems unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur [51].

Nur ein besseres Verständnis des Zusammenspiels zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem erlaubt durch ein immunologisches Monitoring die Identifikation von Risikopatienten und kann durch spezifische Modulation der inflammatorischen Reaktion perioperative Faktoren so beeinflussen, dass das Risiko des septisch bedingten Multiorganversagens nach Einsatz der extrakorporalen Zirkulation reduziert werden kann.

5.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Wir untersuchten 19 Patienten, die sich einer koronaren Bypassoperation unterziehen mussten. Alle Patienten wurden elektiv operiert und waren von Alter, Geschlecht und der Anzahl der zu operierenden Bypässe her vergleichbar. Intraoperativ und in der perioperativen Phase erhielten alle Patienten dieselben Medikamente. Die Volumentherapie wurde mittels transkardiopulmonaler Thermodilution gesteuert, und die Untersucher waren stets dieselben (Volumentherapieregime und perioperative Medikation siehe Algorithmus im Anhang). Keiner der Patienten erhielt in der perioperativen Phase Fremdblutpräparate oder Blutderivate.

Bei allen Patienten wurde vor Operation eine immunologische Ausgangsmessung durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurden während der Narkoseeinleitung, sechs Stunden, sowie 24 Stunden und 48 Stunden später Parameter des unspezifischen sowie des spezifischen Immunsystems nach unserem Messprotokoll bestimmt. Routinelaborparameter wurden durch das Institut der klinischen Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität gemessen. Alle Patienten wurden postoperativ nach gleichen Algorithmen weiter behandelt (siehe Anhang).

5.2 Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses auf das unspezifische Immunsystem

5.2.1 Leukozytäre Subpopulationen und deren Veränderungen

Im Rahmen des immunologischen perioperativen Monitorings untersuchten wir zuerst Parameter des unspezifischen Immunsystems der Patienten vor und nach extrakorporaler Zirkulation. Hierbei wurden Veränderungen von Subpopulationen der Leukozyten im Verlauf gemessen.

Sowohl der prozentuale Anteil als auch der absolute Gehalt an PMNL und Monozyten stieg bereits sechs Stunden nach kardiopulmonalem Bypass signifikant an, während Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten dagegen deutlich abfielen. Diese Lymphopenie, einhergehend mit einer Granulozytose und Monozytose konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden und ist hinreichend bekannt [127]. Die Aktivierung der Zellen und die Veränderung der Zellfraktionen ist dabei auf die direkte Kontaktaktivierung, die Induktion der Komplementkaskade, die Zytokinausschüttung, die Endotoxinämie, sowie auf die Freisetzung von Sauerstoffmonoxid und auf die Ischämiezeit selber zurück zu führen [108].

5.2.2 Expression der Oberflächenantigene β_2 -Integrine und L-Selektine auf PMNL

Es ist bekannt, dass die Exprimierung von P- und E-Selektinen auf der endothelialen Seite und die Expression von L-Selektinen auf PMNL zur Adhärenz der PMNL entlang der Blutkapillaren führt. Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine während herzchirurgischer Eingriffe ist ein potenter Stimulationsmechanismus zur gesteigerten Exprimierung von P-Selektinen entlang des Endothels [50].

Unsere Messungen der L-Selektine ergaben eine signifikante Erhöhung während der Narkoseeinleitung. Im weiteren Verlauf konnte ein kontinuierlicher Abfall beobachtet werden. Die Expression von β_2 -Integrinen auf PMNL war dagegen leicht gesteigert.

Durch die Interaktion von endothelialen P- und E-Selektinen und L-Selektinen verringern PMNL ihre Geschwindigkeit und befinden sich in einem „rollenden“ Zustand entlang der Kapillaren (sog. *rolling*). Um eine engere, adhärente Bindung mit dem Endothel eingehen zu können, werden von den PMNL β_2 -Integrine auf der Zelloberfläche, aktiviert durch lokal gebildete Entzündungsmediatoren, generiert. Im gleichen Zuge werden L-Selektine proteolytisch von der Zelloberfläche abgetrennt (sog. *shedding*) [139]. Durch die Interaktion der β_2 -Integrine mit den intrazellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und ICAM-2 bildet sich ein, gegenüber den Scherkräften des Blutes, stabiler Zellkontakt aus. Der aktivierungsabhängigen, intrazellulären Adhäsion folgt die transendotheliale Diapedese der PMNL [28]. Zur Familie der β_2 -Integrine die auf PMNL in unterschiedlichen Konzentrationen gebildet werden, gehören Glykoproteine, die dem CD11/CD18 Komplex zugeordnet werden. Dazu zählen das *lymphocyte function associated antigen*, LFA-1 (CD11a/CD18), das Mac-1 Antigen (CD11b/CD18) und das p150.95 Antigen (CD11c/CD18) [70]. Es handelt sich um Heterodimere, die aus einer variablen α -Kette (CD11a-c) und einer gemeinsamen β_2 -Kette (CD18) bestehen.

Während des kardiopulmonalen Bypasses werden PMNL durch inflammatorische Stimuli aktiviert [81]. Nach Aktivierung von PMNL durch inflammatorische Stimuli kommt es über innermolekulare Konformationsänderungen zu einer Steigerung der Bindungsaffinität der β_2 -Integrine und zu einer numerischen Hochregulation auf der äußeren Zellmembran. Erhöhte Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen der Selektin- und Integrin-Familie wurden nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses im Plasma von Patienten gemessen [53]. Unsere Ergebnisse könnten Hinweis für eine durch direkten Zellkontakt vermittelte Aktivitätssteigerung der PMNL mit Fremdoberflächenantigenen der

Herz-Lungen-Maschine sprechen. Da es im Verlauf der Messungen bei keinem der Patienten zu weiteren Triggermechanismen eines SIRS, außer dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine während der Bypassoperation kam, kann die leicht erhöhte Expression der β_2 -Integrine unter gleichzeitiger Abnahme der L-Selektine Ausdruck des, auf die Dauer der Operation begrenzten, inflammatorischen Insults sein.

5.2.3 Zymosaninduzierte Adhärenz und Phagozytosefähigkeit von PMNL

Im nächsten Schritt wurde die Funktionalität der polymorphkernigen Leukozyten nach extrakorporaler Zirkulation untersucht. PMNL dienen in erster Linie der Verteidigung des Organismus vor Invasion mit fremden Mikroorganismen. Nachdem Mikroorganismen in den Körper eingedrungen sind, werden sie von PMNL durch Adhärenz gebunden. Nach dieser Bindung werden sie in Form von ummantelten Lysosomen aufgenommen, was der Phagozytose entspricht. Schließlich werden die Mikroorganismen in den Lysosomen durch hoch effiziente bakterizide Mechanismen abgetötet. Hierzu stehen dem PMNL neben zytosolischen Komponenten, wie kationischen Proteinen oder Enzymen, vor allem hochreagible Sauerstoffderivate zur Verfügung. Molekularer Sauerstoff wird dabei durch den Transfer von einem Elektron durch das Enzym Nikotin-adenin-dinukleotid-phosphat-hydrogen (NADPH) -Oxidase zu Superoxidanionen (O_2^-) reduziert. Dem folgend entsteht aus den Superoxidanionen zum einen spontan, zum anderen durch die Superoxid-anionen-dismutase katalysiertes Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Sowohl Superoxidanionen als auch Wasserstoffperoxid können durch weitere Reaktionen untereinander hoch bakterizide Sauerstoffderivate produzieren. Da das katalytische Zentrum der NADPH-Oxidase auf der äußeren Zelloberfläche von PMNL liegt und durch die Bildung von Lysosomen unter Phagozytose die Zellmembran nach innen gestülpt wird, entsteht der größte Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies intrazellulär [49]. Die durch Phagozytose hervorgerufene Inversion der Zellmembran führt also zu einer Minimierung des durch Sauerstoffradikale induzierten Gewebeschadens und zu einer intrazellulären Optimierung der Bakterienabtötung. Die durch unopsonisiertes Zymosan hervorgerufene Adhärenz in unserem Modell zeigte einen nahezu geradlinigen Verlauf und sank nur leicht signifikant zu den Messzeitpunkten während der Narkoseeinleitung und sechs Stunden postoperativ ab. Die Phagozytoserate von unopsonisiertem Zymosan war dagegen signifikant sechs Stunden postoperativ vermindert,

erholte sich 24 Stunden nach der Operation wieder und erreichte bereits 48 Stunden postoperativ wieder das Niveau der Ausgangswerte.

Die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL wird auch als mikrobizide Funktion von PMNL bezeichnet. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass die Induktion von SIRS bzw. Sepsis im Tiermodell zu einer verminderten Phagozytosefähigkeit und der damit assoziierten Sauerstoffradikalproduktion führte [65, 80]. Untersuchungen zur extrakorporalen Zirkulation konnten eine gesteigerte Produktion von lysosomalen Enzymen nach kardiopulmonalem Bypass postoperativ nachweisen [140].

Um die Phagozytose- und Adhärenzfähigkeit und die damit verbundene Sauerstoffradikalproduktion von PMNL nach extrakorporaler Zirkulation zu untersuchen, wurden die PMNL unseres Patientenguts in vitro durch partikuläre Stimuli aktiviert. Zymosanpartikel entstammen dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* und sind als Zellwandpolysaccharide β -glukanreiche Partikel. Für Zymosan konnte gezeigt werden, dass es über zwei Hauptliganden an die Zelloberfläche von phagozytierenden Zellen bindet. Zum einen an die Lektin-Bindungsstelle der α -Kette CD11b des Komplementrezeptors Typ 3 (CR3) und zum anderen über Dektin-1 [20, 21, 63, 117, 143]. Die Bindung von Zymosan an beide Rezeptortypen führt über intrazelluläre Aktivierung von Schlüsselenzymen sowohl zur Phagozytose selbst als auch zur Produktion von Sauerstoffradikalen, Zytokinen und Chemokinen. Dabei interagiert Dektin-1 in der durch Zymosan vermittelten Signalübertragung zur Triggerung von Phagozytose und Zytokinproduktion mit dem *toll-like* Rezeptor (TLR) 2/6-MyD88 [52].

Unsere Ergebnisse sprechen für ein PMNL-Dysfunktionssyndrom, welches Ausdruck eines Signaldefekts der Lektin- bzw. Dektin-1-Bindungsstelle sein könnte. Untersuchungen der Phagozytosefähigkeit von PMNL nach kardiopulmonalem Bypass wurden bisher nicht publiziert. Für Patienten mit Sepsis konnte eine verminderte chemotaktische Funktion von PMNL, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, beobachtet werden [136]. Die Messung der Phagozytoserate von PMNL der Patienten, bei denen eine sekundäre Peritonitis diagnostiziert wurde, war deutlich reduziert [66]. Die bei unseren Patienten beobachtete schnelle postoperative Erholung der Phagozytoserate nach kardiopulmonalem Bypass spricht für einen unkomplizierten postoperativen Verlauf. Die potentielle Gefahr besteht hierbei in der Entwicklung von Folgekrankheiten. So konnte durch Stephan et al. bei kritisch kranken Patienten vor Auftreten einer nosokomialen Pneumonie eine reduzierte Phagozytosefähigkeit von *Staphylococcus aureus* Bakterien nachgewiesen werden [131]. Ähnliche Ergebnisse

lieferten die Untersuchungen von Kaufmann et al. bei Patienten, bei denen verschiedene Schweregrade der Sepsis diagnostiziert wurden [76]. In dieser Studie war die mit der Phagozytose assoziierte Sauerstoffradikalproduktion von unopsonisiertem Zymosan bei den Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock deutlich reduziert. In unserer Studie konnte sechs Stunden nach kardiopulmonalem Bypass eine leicht, aber nicht signifikant reduzierte Sauerstoffradikalproduktion gemessen werden. Vergleichbare Daten nach kardiopulmonalem Bypass existieren derzeit nicht. Die Reduktion der Phagozytose sowie der Phagozytose assoziierten Sauerstoffradikalproduktion kann somit Ausdruck einer transienten Beeinträchtigung des unspezifischen Immunsystems, welche auf den direkten perioperativen Zeitraum nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine begrenzt blieb, sein.

5.2.4 Effekt der Opsonisation auf die zymosaninduzierte Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit

Der Effekt der Opsonisation auf die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit der PMNL unseres Patientenguts nach extrakorporaler Zirkulation wurde als nächster Funktionsparameter im Rahmen des immunologischen Monitorings des unspezifischen Immunsystems untersucht.

Wurde zu den PMNL opsonisiertes Zymosan hinzugegeben, so war die verminderte Phagozytoserate voll reversibel und es wurden im Verlauf konstante Werte bestimmt. Die Adhärenzfähigkeit blieb dabei nahezu unbeeinträchtigt.

Opsonine aus autologem Plasma (wie Immunglobulin G, oder Komponenten der Komplementkaskade, wie C3b, oder C3bi) können sich an Zymosanpartikel anheften. Ihre Aufgabe besteht darin, eine Verknüpfung von Phagozyten und Mikroorganismen zu erleichtern, indem sie als Brücke zwischen beiden fungieren. Brown et al. zeigten, dass Dectin-1 die Produktion von TNF- α als Antwort auf Zymosan neben Toll-like-Rezeptoren induzieren kann und somit die Antwort des Organismus auf Pathogene über spezifische Rezeptoren vermittelt wird [20]. Existiert, wie in unserer Untersuchung, ein Übertragungsdefekt dieser Rezeptoren, kann der Vorgang der Opsonisation diesen Defekt zumindest teilweise kompensieren.

Zudem wurde für den Komplementrezeptor Typ 3 die Affinität zu Immunglobulin G gebundenen Fc γ -Rezeptoren für aktivierte PMNL nachgewiesen [6]. Dieser Mechanismus erleichtert ebenfalls die Vernetzung der Rezeptoren der Signalübertragung zur Erkennung und Elimination von Pathogenen.

Der Komplementrezeptor Typ 3 (CR3) ist ein heterodimerer Komplex, bestehend aus der α -Kette CD11b und der β -Kette CD18. CR3 überträgt nicht nur die Diapedese von Leukozyten, sondern auch die Bindung des Opsonins iC3b [37]. Zudem konnte der Lektinbindungsstelle von CR3 eine hohe Affinität zu β -Glukanen, Zymosan, der Protein-Kinase C vermittelten Phosphorylierung als Schlüssel zur Phagozytosefähigkeit und der damit verbundenen Sauerstoffradikalproduktion nachgewiesen werden [143]. Eine Erhöhung der Zahl an Fc γ -Rezeptoren und von CR3 wird daher als weiterer Kompensationsmechanismus einer verminderten Phagozytosefähigkeit von aktivierten PMNL vorgeschlagen [76].

Die durch opsonisiertes Zymosan induzierte Sauerstoffradikalproduktion war im Gegensatz zu den unopsonierten Zymosanpartikeln zu keinem Zeitpunkt vermindert, was zudem für die oben benannten Kompensationsmechanismen in unserer Untersuchung spricht. Eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion nach Stimulation von PMNL mit opsoniertem Zymosan konnte in einer Studie an 30 kardiochirurgischen Patienten nach kardiopulmonalem Bypass von Pavelkova et al. ebenso gezeigt werden [109].

5.2.5 Effekt der Fremdopsonisation auf die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL

Wie bereits dargestellt können Opsonine aus autologem Plasma eine verminderte Phagozytoserate nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kompensieren.

Zur Kontrolle der beobachteten Effekte wurde in einem weiteren Schritt die Kompensation der reduzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL durch den Effekt der Opsonisation von partikulären Stimuli mit Fremdopsoninen eines gesunden Kontrollplasmapools untersucht. Dabei blieb die Adhärenz- und Phagozytoserate postoperativ ebenso nahezu unverändert.

Die Testung mit Fremdplasma ist bei einer reduzierten Phagozytoserate wertvoll. Ist die Reduktion durch gesundes Fremdplasma reversibel, kann man einen zellulären Defekt, wie am Beispiel von CRPS Patienten in der Studie von Kaufmann et al. gezeigt, weitestgehend ausschließen [77].

Die von uns untersuchten Patienten wiesen nach Opsonisation von Zymosan mit Eigenplasma eine normalisierte Adhärenz- und Phagozytoserate auf. Dies spricht für einen intakten und wichtigen Kompensationsmechanismus. Die Kontrolle der Opsonisation mit Fremdplasma fiel

ebenfalls positiv aus. Insofern kann man davon ausgehen, dass der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine sich nicht negativ auf diesen Kompensationsmechanismus auswirkt.

5.2.6 Spontan und durch lösliche, rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Stimulation induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL

Im Gegensatz zur Elimination von partikulären Stimuli können PMNL auch durch lösliche inflammatorische Substanzen, wie das chemotaktische Tripeptid N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Komplementfaktor C5a, oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aktiviert werden. Dieser Stimulationsmechanismus führt über die auf der Zellmembranaussenseite lokalisierte NADPH-Oxidase zur Produktion von Sauerstoffradikalen in den Extrazellularraum [68]. Nach Adhärenz an die Endothelzellschicht wird die Menge der Sauerstoffradikalproduktion von PMNL nach Aktivierung über lösliche Stimuli durch einen über β_2 -Integrine übertragenen Signalweg noch mehr erhöht und führt damit zu einer ausgeprägten Gewebeschädigung [144]. Um das Ausmaß der Sauerstoffradikalproduktion von PMNL nach extrakorporaler Zirkulation zu untersuchen, wurden PMNL in vitro zum einen durch fMLP allein und in Kombination mit TNF- α inkubiert. Der Stimulationsmechanismus ist rezeptorabhängig und wird über G-Protein vermittelte, Kalzium-abhängige Aktivierung der Calmodulinkinase und Proteinkinase C (PKC) erreicht.

Die mit fMLP stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL war 48 Stunden nach Ende der extrakorporalen Zirkulation signifikant gegenüber den Vorwerten erhöht. Die Sauerstoffradikalproduktion von PMNL, die mit TNF- α und fMLP kombiniert stimuliert wurden, stieg simultan nach 48 Stunden an. Die Höhe der rezeptorabhängigen Stimulation, die sich aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten ergaben, war in der Untersuchungsreihe, wie erwartet, für die Kontrolle am niedrigsten, gefolgt von der alleinigen Stimulation mit fMLP, gefolgt von der Stimulation mit fMLP in Kombination mit TNF- α . PMNL der nicht stimulierten Kontrollansätze zeigten während der Messungen keine signifikanten Unterschiede.

Bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen, unter Zuhilfenahme des kardiopulmonalen Bypasses konnte ebenfalls eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion der neutrophilen Granulozyten bereits in früheren Studien nachgewiesen werden [81, 140]. Der Vergleich zwischen Normothermie und Hypothermie während extrakorporaler Zirkulation bestimmte dabei den Beginn der Inflammation, gekennzeichnet durch die Sauerstoffradikalproduktion.

Die Gruppe unter hypothermen Bedingungen zeigte einen verzögerten Beginn der inflammatorischen Antwort. Patienten, die sich im septischen Schock befanden, wiesen gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe eine höhere spontane Sauerstoffradikalproduktion auf [76].

Unsere Patienten wurden während der Bypasszeit unter milden hypothermen Bedingungen (ca. 32°C) behandelt. Die beobachtete signifikante Erhöhung der Sauerstoffradikalproduktion nach 48 Stunden ist mit bisherigen Daten als Ausdruck der Aktivitätssteigerung von PMNL gut vereinbar. Diese Aktivitätssteigerung ist vor allem Ausdruck einer Hochregulation von fMLP Rezeptoren und geht mit einer Sensibilisierung der PMNL gegenüber der rezeptorabhängigen Stimulation einher [141].

Ebenso wurde die Sauerstoffradikalproduktion von PMNL, die mit dem Kalziumionophor A23187 und mit dem Phorbol-ester Phorbol-myristat-acetat (PMA) inkubiert wurden, untersucht. Die beiden löslichen Stimuli A23187 und PMA umgehen dabei die Stimulationsrezeptoren auf der Außenseite der Zellmembran durch direkte Aktivierung über Kalzium bzw. über die direkte Aktivierung der Calmodulinkinase und Proteinkinase C intrazellulär.

Die Sauerstoffradikalproduktion der PMNL auf PMA als Stimulus war bereits sechs Stunden nach Operationsende deutlich reduziert. A23187 wies bis auf eine Erhöhung zum Messzeitpunkt 4 keine Veränderungen in den Werten auf. Das während der Messungen beobachtete, verminderte Ansprechen der PMNL auf PMA konnte ebenso bei Patienten in der Sepsis nachgewiesen werden [76]. Eine Erklärung dieses Effekts besteht in der Tatsache, dass PMNL in der Phase einer beginnenden Inflammation bereits durch unterschwellige Konzentrationen von inflammatorischen Mediatoren aktiviert werden. Diese Aktivitätssteigerung spiegelt sich dann vor allem in erhöhten, intrazellulären Kalziumspiegeln wieder [29, 126].

Zusammengefasst kann die Untersuchung der Menge der von PMNL produzierten Sauerstoffradikale Ausdruck einer rezeptorabhängigen Hochregulation sein, die mit einer deutlichen Sensibilisierung der PMNL über systemische Inflammation mittels extrakorporaler Zirkulation einhergeht. Zudem wurde eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion durch A23187 nachgewiesen. Dies kann Ausdruck einer Aktivitätssteigerung über Akkumulation von intrazellulärem Kalzium in PMNL sein. Beide Wege, sowohl die rezeptorabhängige als auch die rezeptorunabhängige Stimulation, sprechen insgesamt für eine erhöhte Aktivität der PMNL nach extrakorporaler Zirkulation.

5.3 Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses auf das spezifische Immunsystem

5.3.1 Veränderungen von lymphozytären Subpopulationen

Im Rahmen des immunologischen, perioperativen Monitorings wurden die Auswirkungen des kardiopulmonalen Bypasses auf Veränderungen von lymphozytären Subpopulationen hin untersucht. Es wurde zum einen der prozentuale Anteil als auch der absolute Gehalt der Lymphozytensubpopulationen bestimmt.

Unsere Messungen zeigten für alle Lymphozytensubpopulationen eine Erniedrigung der absoluten Zellzahlen. Die Fraktion der gesamten T-Lymphozyten fiel sechs Stunden nach extrakorporaler Zirkulation signifikant ab. Ebenso verhielten sich T-Helferzellen und fielen ebenfalls sechs Stunden postoperativ ab, wobei der Anteil der T-Killerzellen relativ konstant blieb. CD3 negative Natürliche Killerzellen stiegen hoch signifikant sechs Stunden nach Operationsende an. Die Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen blieben dabei insgesamt auf den Zeitraum bis 24 Stunden nach Operation begrenzt.

Viele Studien haben bereits Veränderungen der Zellpopulationen des spezifischen Immunsystems bei herzchirurgischen Eingriffen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine untersucht [1]. Allerdings waren die Ergebnisse dieser Studien sehr unterschiedlich. Obwohl Veränderungen der Anzahl von leukozytären Subpopulationen, wie Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten vergleichbar blieben, unterschieden sich in diesen Untersuchungen die Ergebnisse vor allem in der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen [32, 34, 71, 93, 103, 104]. Es ist bekannt, dass Veränderungen der T-Helferzellzahlen als Reaktion auf das chirurgische Trauma, bedingt durch eine Operation, eine Schlüsselrolle in den immunologischen Folgereaktionen einnehmen können. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass eine Reduktion der Zellzahlen von T-Lymphozyten selber durch mechanische Irritation bedingt sein kann und auf direkte Apoptose zurück zu führen ist. Dieser Schädigungsmechanismus wurde für eine konsekutive Erniedrigung von proinflammatorischen Zytokinen in einer Studie von Ankersmit et al. bei Patienten mit links-ventrikulärem Unterstützungssystem identifiziert [2].

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen blieb das Blut unserer Patienten den mechanischen Beeinträchtigungen nur vergleichsweise kurz, begrenzt auf die Dauer der Operation, ausgesetzt. Dennoch führte bereits diese kurze Exposition gegenüber Fremdmaterial zu

deutlichen oben beschriebenen Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen. Die sich daraus ergebenden möglichen Beeinträchtigungen der Funktionalität der Lymphozyten wurden im Folgenden untersucht.

5.3.2 Veränderungen von zytokinproduzierenden T-Lymphozyten

Für herzchirurgische Eingriffe mit kardiopulmonalem Bypass konnten deutliche Veränderungen der Funktionen der T-Helferzellen durch Bestimmung erhöhter Spiegel an Interleukin-2 und -6 oder durch Nachweis spezifischer Antikörperproduktionen gezeigt werden [93, 104].

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Veränderungen der Zytokinprofile der T-Zellpopulationen für unser Patientengut untersucht. Es wurde zum einen der gesamte Anteil der zytokinproduzierenden, CD3 positiven T-Lymphozyten bestimmt. Zum anderen wurden die Anteile der zytokinproduzierenden T-Lymphozytensubpopulationen, CD4 positiver T-Helferzellen und CD8 positiver T-Killerzellen bestimmt. Da die Produktion der Zytokine Folge einer zellulären Stimulation ist, wurden die Zellansätze durch in vitro Stimulation aktiviert. Nach der Separation der T-Zellen und T-Zellsubtypen mit Antikörpermarkierung wurden die Zytokine mittels monoklonalen Zytokinantikörpern gefärbt und gemessen [47, 123, 124].

Als Marker der Proinflammation wurden T-Zellfraktionen bestimmt, die Interleukin-2 und Interferon- γ produzierten. CD3 positive, Interleukin-2 produzierende T-Zellen fielen hoch signifikant 6 Stunden postoperativ ab. Dieser Abfall konnte ebenso für Interleukin-2 produzierende, CD4 positive T-Helferzellen und CD8 positive T-Killerzellen nachgewiesen werden. Bereits 24 Stunden nach Operationsende waren diese Erniedrigungen rückläufig. Interferon- γ produzierende T-Lymphozyten zeigten dagegen im Verlauf keine signifikanten Veränderungen.

Als Marker der Antiinflammation wurde der Anteil an Interleukin-4 und Interleukin-10 produzierenden T-Lymphozyten bestimmt. Alle Interleukin-4 produzierenden T-Lymphozytensubpopulationen zeigten eine deutliche postoperative Erhöhung beginnend sechs Stunden nach extrakorporaler Zirkulation. Ebenso wurde ein erhöhter Anteil an Interleukin-10 produzierenden CD3, CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten postoperativ bestimmt.

Während Interleukin-2 vor allem von proinflammatorischen TH1-Zellen produziert wird, werden antiinflammatorische Zytokine vornehmlich durch TH2-Zellen ausgeschüttet. Da die Patienten in unserer Untersuchung eine Erhöhung der TH2-Zellaktivität sowie eine Erniedrigung der TH1-Zellaktivität aufweisen handelt es sich um einen TH1/TH2-*Shift*. TH1-Zellen aktivieren Makrophagen, die in ihrem Zellinneren befindliche Erreger abtöten können und somit für die zelluläre Immunität verantwortlich sind. TH2-Zellen stimulieren die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und fördern so die humorale Immunität [42]. Eine Polarisation zugunsten einer TH2-Antwort hemmt die für die Abwehr von Infektionen erforderliche TH1-Antwort. Dieser Prozess wird in der Literatur für eine Reduzierung der Funktionen des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems bei Patienten mit dem Krankheitsbild der Sepsis verantwortlich gemacht.

Bei Patienten mit herzchirurgischen Eingriffen unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine konnte der TH1/TH2-*Shift* als Marker postoperativer Komplikationen und eine schlechte Prognose gewertet werden [94, 103, 135, 151]. Mechanische Irritationen über die Fremdoberfläche der Herz-Lungen-Maschine, sowie eine unspezifische Aktivierung der Lymphozyten über die extrakorporale Zirkulation, als auch Hämodilutionseffekte werden als Ursachen diskutiert [31, 35, 110]. Die Polarisation zu TH2-Zellen führt zu einer reduzierten Ausschüttung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen in der Frühphase nach extrakorporaler Zirkulation und macht den Organismus anfällig für Infektionen.

In der Literatur gibt es eine anhaltende Diskussion, ob die Veränderung der immunologischen Funktionen durch eine Verminderung des absoluten Gehalts an T-Lymphozytensubpopulationen, wie sie auch in unserer Studie gemessen werden konnte, an sich bedingt ist, oder durch eine direkte, funktionelle Schädigung der Zellen zu Stande kommt [38, 94, 103]. Neuere Untersuchungen favorisieren den Mechanismus der funktionellen Schädigung der T-Helferzellen [51]. In den Ergebnissen der meisten Untersuchungen kommt es zu einer Reduktion der Zellzahlen. Trotz einer Erniedrigung bestimmter T-Zellsubpopulationen kommt es zu einer Hochregulation von zytokinproduzierenden T-Zellfraktionen. Eine Erklärung dieses Phänomens kann darin begründet sein, dass ein Teil der Lymphozyten im Rahmen der Inflammation zu ihrem Ursprungsort in lymphatische Gewebe zurückkehrt und so eine reduzierte Zahl im peripheren Blut gemessen wird. Die Zytokinproduktion bleibt dadurch unbeeinträchtigt, und es kann zu einem TH1/TH2-Shift kommen [51].

5.4 Perioperative Beeinflussung immunologischer Veränderungen

Um das Ausmaß der immunologischen Veränderung, die durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine selbst bedingt waren, besser von präoperativen Einflußfaktoren auf das Immunsystem unterscheiden zu können, wurden alle immunologischen Messparameter wie oben beschrieben zu zwei Messzeitpunkten vor der eigentlichen Operation bestimmt. Einflussfaktoren, wie Stress oder Angst, aber auch die eingesetzten Medikamente zur Narkoseinduktion und Narkoseaufrechterhaltung, sowie verabreichte Katecholamine zur Unterstützung der Herz-Kreislauffunktionen ziehen immunologische Folgereaktionen nach sich.

5.4.1 Einfluss von Stress auf das Immunsystem bei herzchirurgischem Eingriff

Patienten, die vor einer kardiochirurgischen Operation stehen, haben ein erhöhtes Stresspotential und leiden teilweise unter Angst. Unsere Messungen ergaben bereits Veränderungen des immunologischen Status zwischen der Ausgangsmessung und dem Messzeitpunkt direkt nach Anästhesieinduktion.

Die Oberflächenantigene L-Selektin und β_2 -Integrine waren in unserer Untersuchung auf PMNL nach Narkoseeinleitung gegenüber den Ausgangsmessungen erhöht. Signifikant war hier die Erhöhung der L-Selektine. Die Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von Zymosan durch PMNL war reduziert. Die durch Zymosan induzierte Sauerstoffradikalproduktion war im Gegensatz zur Sauerstoffradikalproduktion durch rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Stimuli signifikant niedriger. Der Anteil an Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, sowie CD3 positiven natürlichen Killerzellen war geringer. Die Anteile von Interleukin-2 produzierenden T-Killerzellen und Interleukin-10 produzierenden T-Helferzellen waren erhöht.

Psychologischer Stress, wie zum Beispiel Angst vor einer großen Operation, kann die Freisetzung des *Corticotropin-Releasing* Hormons (CRH) aus dem Hypothalamus induzieren und zu einer systemischen Ausschüttung von Glukokortikoiden und Katecholaminen, vornehmlich Adrenalin und Noradrenalin, führen, die potentiell immunologisch wirksam sein können [149]. Die Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren auf Antigen-präsentierenden-

Zellen (APC) supprimiert die Freisetzung von Interleukin-12. Eine Verminderung von Interleukin-12 reduziert die Differenzierung zu TH1-Zellen [12, 41]. Des Weiteren wird die Expression von Interleukin-12-Rezeptoren auf T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen reduziert, was eine verminderte Sekretion von Interferon- γ zur Folge hat [150].

Eine aktuelle Studie von Arranz et al. untersuchte und verglich immunologische Veränderungen eines ängstlichen Frauenkollektivs mit bisher publizierten Daten und tierexperimentellen Studien [3]. Die Sauerstoffradikalproduktion von neutrophilen Leukozyten war erhöht. Die Phagozytoserate war reduziert. Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren tierexperimentellen Studien und auch in Studien am Menschen nachgewiesen [58-60, 87, 122, 129].

Alle genannten immunologischen Veränderungen in unserer Studie waren gering ausgeprägt und hatten dabei keinen Krankheitswert per se. Sie zeigen vielmehr, dass bereits erste immunologische Veränderungen in der Phase kurz vor Operation beginnen und durch das immunologische Monitoring erfasst werden konnten.

5.4.2 Beeinflussung des Immunsystems durch die zur Narkose eingesetzten Medikamente

Veränderungen des immunologischen Status in der perioperativen Phase werden ebenfalls durch die Wahl und den Einsatz der Medikamente zur Narkoseinduktion und Narkoseaufrechterhaltung beeinflusst.

Unsere Patienten erhielten zur Narkoseeinleitung Sufentanil, Midazolam und Pancuronium. Die Narkose wurde als balancierte Anästhesie mit Isofluran und Sufentanil aufrecht erhalten. Midazolam und Pancuronium besitzen in klinisch angewendeten Dosierungen keinen bzw. nur einen transienten Effekt auf die Immunologie [36, 107].

Es ist bekannt, dass volatile Anästhetika dosisabhängig einen hemmenden Effekt auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten haben. Sie unterdrücken die Zytokinfreisetzung, erniedrigen die Lymphozytenproliferation und können eine Lymphozytenapoptose induzieren [19, 97, 101, 102]. Unabhängig von deren immunologischen Wirkungen haben biophysikalische Studien für volatile Anästhetika gezeigt, dass sie bei neurodegenerativen Erkrankungen die Aggregation von zytotoxischen und neurodegenerativen Proteinen, wie Amyloid- β Peptid, der Alzheimerschen Erkrankung erleichtern [39]. Auf der anderen Seite

wirken volatile Anästhetika über ihre präkonditionierenden Effekte antiinflammatorisch und kardioprotektiv [67].

Opioide beeinflussen das Immunsystem auf der einen Seite über die Opioidrezeptoren, die auf immunkompetenten Zellen exprimiert werden, und zum anderen über die Teilnahme am zentralen Nervensystem, sowie über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [10, 116]. Es ist bekannt, dass Morphin dosisabhängig die Funktion des Immunsystems durch Minderung der Monozytenfunktion und der Funktion der neutrophilen Granulozyten, sowie durch Beeinträchtigung der zellvermittelten Zytotoxizität, der Lymphozytenproliferation und der Zytokinausschüttung herunter reguliert. Studien zu synthetischen Opioiden haben gezeigt, dass die Auswirkungen auf das Immunsystem nur vorübergehend sind und keine Veränderungen der direkten immunologischen Antwort nach sich ziehen [11, 73].

Die immunologischen Veränderungen zwischen den Ausgangswerten und den Messzeitpunkten direkt nach Narkoseeinleitung können daher teilweise auch durch die zur Narkose eingesetzten Medikamente induziert sein und beeinflusst werden.

5.4.3 Einfluss von Katecholaminen auf das Immunsystem bei herzchirurgischem Eingriff

Zur Aufrechterhaltung der Makrohämodynamik werden während eines herzchirurgischen Eingriffes Katecholamine eingesetzt. In unserem Patientenkollektiv kam ausschließlich Noradrenalin zum Einsatz.

Im Rahmen des unspezifischen Immunsystems konnte von Kaufmann et al. gezeigt werden, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Fähigkeit zur Phagozytose von PMNL beeinflusst werden. So war die Expression von β_2 -Integrinen und die Phagozytoserate in Anwesenheit von den Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin in vitro reduziert [77]. Diese Ergebnisse stimmen mit weiteren Untersuchungen zur Phagozytose- und Adhärenzfähigkeit von neutrophilen Granulozyten überein [86, 130].

Katecholamine besitzen ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften auf das spezifische Immunsystem. Sie führen über Antigen präsentierende Zellen und TH1-Zellen zum TH1/TH2-Shift. Noradrenalin und Adrenalin inhibieren die Produktion von Interleukin-12 und stimulieren die Ausschüttung von Interleukin-10 [41]. Diese Effekte werden über β -Adrenorezeptoren vermittelt. β_2 -Adrenorezeptoren befinden sich ausschließlich auf TH1-Zellen, nicht jedoch auf TH2-Zellen. So verhindern β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten die

TH1-Zelldifferenzierung zu Gunsten der TH2-Zellen, was den Mechanismus des durch Katecholamine bedingten TH1/TH2-Shifts erklären kann [78, 125]. Proinflammatorische Zytokine werden somit durch die Katecholaminwirkungen vermindert.

5.4.4 Ausblicke und Therapieoptionen bei herzchirurgischem Eingriff

Präoperativ bestehende Level an Stress und Angst vor der Operation oder die eingesetzten Medikamente zur Narkoseführung haben vor Beginn der eigentlichen Operation, wie in den Daten gezeigt, nur eine geringe immunmodulatorische Auswirkung. Der eigentliche Zeitraum in dem die entscheidenden Veränderungen, die den Patienten gefährden können, entstehen in der perioperativen Phase.

Ziel muss es daher sein, präventive Therapiekonzepte zu entwickeln, die das SIRS bereits während kardiochirurgischer Eingriffe minimieren, um weiteren, teils lebensbedrohlichen Folgekrankheiten zu begegnen.

Chirurgische Techniken, ein differenziertes Management der Herz-Lungen-Maschine, die Verbesserung ihrer Biokompatibilität, Hämofiltration, die Optimierung der hämodynamischen Stabilität, spezielle Anästhetika und immunmodulatorische Substanzen können eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion nach extrakorporaler Zirkulation bewirken.

5.4.4.1 Koronare Revaskularisation ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine

Mehrere prospektiv randomisierte Studien verglichen Herzoperationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine mit der *OFF-Pump* Prozedur ohne Herz-Lungen-Maschine (*off-pump-coronary-artery-bypass* – OPCAB) bei Patienten, die ein niedriges perioperatives Risikoprofil hatten. Es ergab sich eine Verkürzung der Beatmungsdauer, des Aufenthalts auf der Intensivstation, der Krankenhausverweildauer sowie reduzierte Parameter der Inflammation wie Komplement C3a, Elastase, Interleukin-8 und TNF- α [4, 5, 96, 113]. Der Vergleich einer Patientengruppe mit rechtsventrikulärem Unterstützungssystem (*right-ventricular-assist-device* – RVAD) mit OPCAB-Patienten und einer Gruppe mit Operationen mit Herz-Lungen-Maschine ergab für RVAD- und OPCAB-Patienten gleich niedrige Werte an Interleukin-6, Interleukin-8 und C3a. Dagegen waren diese Parameter signifikant in der Gruppe der

Patienten mit passagerer extrakorporaler Zirkulation erhöht [24]. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da der Einsatz eines RVAD ebenso eine Heparinisierung und den Einsatz von Protamin nötig macht. Zudem wird das Blut einer mechanischen Pumpe und einer Fremdoberfläche wie bei der extrakorporalen Zirkulation zugeführt. Allerdings ist der Einsatz eines Membranoxygenators zur Sauerstoffaufsättigung des Bluts im Aufbau eines RVAD nicht vorhanden [90].

5.4.4.2 Therapieoptionen während herzchirurgischer Eingriffe

Fest steht, dass es nach kardiopulmonalem Bypass zu einer systemischen Inflammation kommt. Im Folgenden werden mögliche Therapieoptionen vorgestellt, für die eine Reduktion der Inflammation nachgewiesen werden konnte.

Abgesaugtes, mediastinales Blut, welches durch maschinelle Autotransfusion wiederaufbereitet und gereinigt wurde, reduzierte die Menge von TNF- α , Interleukin-6 und Komplementfaktor C3a [128, 147]. Eine unzureichende intraoperative Gerinnungsinhibition, wie sie für den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine essentiell ist, resultierte in einer gesteigerten Inflammation postoperativ [46].

Die Verbesserung der Biokompatibilität der Herz-Lungen-Maschine mittels Heparinbeschichtung des kompletten Systems hatte in mehreren, prospektiv randomisierten Studien eine Verminderung von Interleukin-6 und TNF- α , eine Optimierung des Gasaustausches, sowie verbesserte Organfunktionen, einen geringeren Myokardschaden und eine Verkürzung des Intensivaufenthalts und der Beatmungsdauer zur Folge [33, 114, 132].

Hämofiltration während extrakorporaler Zirkulation kann signifikante Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1, Interleukin-6, TNF- α , oder Komplementfaktoren, wie C3a und C5a eliminieren [134].

Der Vergleich verschiedener Anästhetika ergab für Propofol in der Reperfusionsphase in einer prospektiv randomisierten, verblindeten Studie sechs Stunden postoperativ niedrigere Konzentrationen an Interleukin-6 und Interleukin-8 im Serum der Patienten [27]. Ein Vergleich von Propofol mit dem Inhalationsanästhetikum Sevofluran zeigte in der Gruppe der mit Sevofluran behandelten Patienten einen geringeren Anstieg von Interleukin-6, Interleukin-8, der CK-MB und von Troponin T, als Ausdruck des myokardialen Zellschadens [79].

Pentoxifyllin ist ein unspezifischer Phosphodiesteraseinhibitor, der in diesem Kontext an Interesse gewonnen hat. So hemmt Pentoxifyllin die Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und fördert die Produktion von Prostaglandin I₂. Außerdem beeinflusst Pentoxifyllin die Funktion der Monozyten, Thrombozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Endothelzellen antiinflammatorisch [14]. Studienergebnisse zur perioperativen Anwendung von Pentoxifyllin ergaben eine Verminderung von TNF- α , Interleukin-6, Interleukin-8, sowie weniger Adhäsionsmoleküle, einer geringeren Hämolyserate und verbesserten Organfunktion [22, 40, 55, 72].

Auch Kortisonderivate kommen zur Kontrolle des SIRS nach extrakorporaler Zirkulation zum Einsatz. Studien mit Hydrokortison und Methylprednisolon zeigen dabei Benefit. So konnte der Einsatz von Hydrokortison bei einer Hochrisikogruppe bei diesen Patienten die Rate an Organdysfunktionen reduzieren. Ebenfalls waren die Konzentrationen an Interleukin-6, sowie der Katecholaminbedarf niedriger [82] [148].

Eine Immunmodulation kann auch durch Immunonutrition erreicht werden. So gibt es zunehmend Hinweise, dass Omega-3 Fettsäuren bei herzchirurgischen Patienten bei präoperativem Therapiebeginn einen positiven Effekt haben [61]. Das Auftreten von postoperativem Vorhofflimmern war in einer anderen Studie zu Omega-3 Fettsäuren um 55 Prozent reduziert [23]. In einer prospektiv randomisierten Doppelblindstudie einer Patientengruppe mit relativ hohem Risiko wurde die Nahrung präoperativ mit L-Arginin, Omega-3 Fettsäuren und RNA-Eiweiß ergänzt. Hierbei ergaben sich reduzierte Interleukin-6 Spiegel, ein geringerer Transfusionsbedarf, sowie eine verbesserte Kreatinin-Clearance in Verbindung mit einem geringeren Flüssigkeitsbedarf [137].

Eine Reihe von neueren Therapieoptionen zur Reduktion der inflammatorischen Reaktionen nach kardiochirurgischen Operationen werden in der Literatur diskutiert und vorgestellt. Patienten, bei denen ein hohes perioperatives Risiko aufgrund von Nebenerkrankungen, Alter, oder vergangenen Herzoperationen besteht sollten ein angepasstes Therapieregime erhalten, um den inflammatorischen Insult nach extrakorporaler Zirkulation zu verringern.

6.0 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, Veränderungen des unspezifischen und des spezifischen Immunsystems in der perioperativen Phase bei Patienten, die sich einer Bypassoperation unter Zuhilfenahme der extrakorporalen Zirkulation unterziehen mussten, zu erfassen. Es wurden 19 Patienten untersucht, die durchschnittlich drei Bypassgefäße erhielten und vom Alter her vergleichbar waren. Alle Patienten durchliefen das Studienprotokoll ohne Komplikationen, konnten zeitnah nach Extubation von der Intensivstation verlegt werden und hatten eine relativ kurze Krankenhausverweildauer.

Im Ergebnis wurde gezeigt, dass bereits erste immunologische Veränderungen vor der eigentlichen Operation beginnen. Sie waren allerdings nur gering ausgeprägt und hatten keinen Krankheitswert. Faktoren, wie präoperativer Stress, aber auch die, während der Narkoseeinleitung eingesetzten Medikamente können diese immunmodulatorischen Wirkungen nach sich ziehen und werden durch das vorgestellte Immunmonitoring erfasst.

Eine systemische Inflammation konnte nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in Form einer leicht ausgeprägten Leukozytose, in Verbindung mit einer deutlichen Erhöhung von Interleukin-6 und CRP im Rahmen des klinischen Routinelabors erfasst werden. Zytotoxische Funktionen durch PMNL der unspezifischen Immunität waren insgesamt erhöht. Dies konnte durch eine gesteigerte Sauerstoffradikalproduktion der PMNL gezeigt werden. Die Zunahme der Sauerstoffradikalproduktion lieferte erst 48 Stunden nach Operationsende signifikante Messergebnisse und kann so Ausdruck einer verzögerten inflammatorischen Reaktion sein. Mikrobizide Funktionen der unspezifischen Immunität ergaben eine frühe postoperative Erniedrigung der Phagozytose, sowie der Phagozytose-assoziierten Sauerstoffradikalproduktion. Dieses Ergebnis spricht für ein beginnendes PMNL-Dysfunktionssyndrom, welches auf einen Signaldefekt der Rezeptoren Lektin- bzw. Dektin-1 zurück geführt werden könnte. 48 Stunden nach Operation war es wieder reversibel.

Die spezifische Immunität war vor allem durch Lymphopenie und besonders durch eine Reduzierung der T-Helferzellen postoperativ gekennzeichnet. Eine Polarisation hin zu den TH2-Zellen wurde gemessen. Im Rahmen der Bestimmung des Anteils an zytokinproduzierenden T-Helferzellen, T-Killerzellen und der T-Lymphozyten als Gesamtheit ergab sich ein deutlicher Abfall der Interleukin-2-produzierenden Zellen. Der Anteil an Interleukin-4- und Interleukin-10-produzierenden Zellen war dagegen erhöht. Durch die so

gemessene, verminderte Funktion der TH1-Zellen in Verbindung mit einer Erhöhung der TH2-Zellaktivität konnte ein TH1/TH2-*Shift* erkannt werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der kardiopulmonale Bypass zu einer Hyperinflammation in Verbindung mit einer Immunsuppression führt.

Obwohl das Potential einer Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren erkannt wurde, erholen sich die meisten Patienten nach einer Herzoperation ohne Folgeschäden. Nur eine geringe Anzahl entwickelt mitunter lebensbedrohliche Komplikationen im Rahmen der postoperativen Phase. So besteht die Herausforderung für die Zukunft darin, diejenigen inflammatorischen Mechanismen zu identifizieren, die für eine spezifische Patientengruppe potentiell gefährdend sind. Während eine aggressive, immunmodulatorische Therapie, eine Patientengruppe vor Folgekrankheiten schützt, kann eine andere Patientengruppe genau dadurch gefährdet werden. Hierbei spielen genetische Prädispositionen des individuellen Immunsystems eines Patienten eine sehr große Rolle.

Eine präoperative Evaluierung des jeweiligen Immunstatus in Verbindung mit einer Identifikation von Risikopatienten kann zu einer gezielten perioperativen Immunmodulation beitragen, welche Folgeschäden verhindern sollen. Davor muss allerdings das Immunsystem als Ganzes betrachtet werden und die Veränderung der einzelnen Komponenten der verschiedenen Patientengruppen erfasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einer Patientengruppe mit dem hier vorgestellten immunologischen Monitoring erstmals sowohl das unspezifische als auch das spezifische Immunsystem gleichzeitig analysiert und bewertet. Weitere Untersuchungen über das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Faktoren, auch über den untersuchten Zeitraum hinaus, müssen folgen, um gezielte therapeutische Ansätze für die Zukunft zu finden.

7.0 Inkubationen

7.1 Bestimmung von β_2 -Integrinen und L-Selektinen:

Zeit [min]	IB4-fab	D200-fab	
0	20 μ l Blut mit 20 μ l Antikörper	20 μ l Blut mit 20 μ l Antikörper	immer
20	750 μ l BD Lysereag.	750 μ l BD Lysereag.	eisgekühlt
65	Waschen*	Waschen*	

* Wäsche: mit kalter HBSS - Lsg. auffüllen, 5min bei 2500 U/min

Abb. 35: Inkubationsschema zur Bestimmung von β_2 -Integrinen und L-Selektinen auf PMNL;

7.2 Zymosan- und opsonisations-induzierte Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL

Zeit [min]	FITC ZYM	FITC PTZ	FITC PTZ Fremdpl.	x °C	
-30		0,5 ml Plasma mit _ μ l Zym FITC	0,5 ml Plasma mit _ μ l Zym FITC	37°C	A1 A1 A1 A1 A1
0		Waschen*	Waschen*		
-10	0,5 ml HBSS	0,4 ml HBSS	0,4 ml HBSS	37°C	A2 A2 A2 A2 A2
0	10 μ l Leuk.	10 μ l Leuk.	10 μ l Leuk.		A2 A2
10	_ μ l Zy Fl.	A2 zu A1	A2 zu A1		
40	20 μ l LDS u. auf Eis	20 μ l LDS u. auf Eis	20 μ l LDS u. auf Eis	4°C	
	2 Messungen: ohne und mit HCL im Verh.1:100				

Abb. 36: Inkubationsschema zur Bestimmung der Zymosan- und Opsonisationsinduzierten Adhärenz- und Phagozytosefähigkeit von PMNL; Waschen: mit kalter HBSS Lösung 5 Minuten bei 2500 U/min; A1: Ansatz 1; A2: Ansatz 2; Zym: Zymosan; PTZ: mit Plasma behandeltes Zymosan; FITC: Fluoreszeinthyocyanat; LDS: Quinolinium-Phenyl-Butadienyl-Ethyl-Perchlorat; HCL: Salzsäure;

7.3 Phagozytose induzierte Sauerstoffradikalproduktion von PMNL

Zeit [min]	DHR PART K	DHR ZYM	DHR PTZ	x°C	
-30			0,5 ml Plasma mit _ µl Zymosan	37°C	R1 R1 R1 R1
0			Waschen*		R1
-10	0,5 ml HBSS	0,5 ml HBSS	0,4 ml HBSS	37°C	R2 R2 R2 R2
0	10 µl Leuk. m. 5µl DHR	10 µl Leuk. m. 5µl DHR	10 µl Leuk. m. 5µl DHR		R2 R2
10		_ µl Zym	R2 zu R1		
40	20 µl LDS u. auf Eis	20 µl LDS u. auf Eis	20 µl LDS u. auf Eis	4°C	

* Partikel Wäsche mit 2x mit HBSS-Lsg., 5min bei 5000 U/min

Abb. 37: Inkubationsschema zur Bestimmung der Phagozytose induzierten Sauerstoffradikalproduktion von PMNL; R1: Röhrchen 1; R2: Röhrchen 2; Part: Partikel; K: Kontrolle; Zym: Zymosan; PTZ: mit Plasma behandeltes Zymosan; LDS: Quinolinium-Phenyl-Butadienyl-Ethyl-Perchlorat;

7.4 Spontan und durch lösliche Stimuli induzierte zytotoxische Sauerstoffradikalproduktion

Zeit[min]	DHR K	DHR FMLP	DHR TNF/FMLP	DHR A23	DHR PMA	x°C
0	1 ml HBSS	1 ml HBSS	1 ml HBSS	1 ml HBSS	1 ml HBSS	37°C
10	20 µl Leukozyt. und 10 µl DHR	20 µl Leukozyt. und 10 µl DHR	20 µl Leukozyt. und 10 µl DHR	20 µl Leukozyt. und 10 µl DHR	20 µl Leukozyt. und 10 µl DHR	
15			10 µl TNF			
20		10 µl FMLP	10 µl FMLP	50 µl A23	10 µl PMA	
35	10µl PI und 20µl LDS	10µl PI und 20µl LDS	10µl PI und 20µl LDS	10µl PI und 20µl LDS	10µl PI und 20µl LDS	
45	Auf Eis	Auf Eis	Auf Eis	Auf Eis	Auf Eis	0°C

Abb. 38: Inkubationsschema zur Bestimmung der Spontan und durch lösliche Stimuli induzierten zytotoxischen Sauerstoffradikalproduktion von PMNL; K: Kontrolle; FMLP: formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; TNF: Tumornekrosefaktor-α; A23: Calcium Ionophore A23187; PMA: Phorbol-myristat-acetat; LDS: Quinolinium-Phenyl-Butadienyl-Ethyl-Perchlorat; PI: Propidiumjodid;

7.5 Bestimmung leukozytärer Subpopulationen anhand des Simultest™ IMK

Zeit [min]	IMK A	IMK B	IMK C	IMK D	IMK E	IMK F
0	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. A	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. B	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. C	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. D	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. E	50 µl Blut mit 10 µl Lsg. F
20	1ml IMK Lyse-lsg.	1ml IMK Lyse-lsg.	1ml IMK Lyse-lsg.	1ml IMK Lyse-lsg.	1ml IMK Lyse-lsg.	1ml IMK Lyse-lsg.
30	Waschen*	Waschen*	Waschen*	Waschen*	Waschen*	Waschen*

* IMK Wäsche: mit kalter HBSS - Lsg. auffüllen, 5min bei 2500 U/min

Abb. 39: Inkubationsschema zur Bestimmung leukozytärer Subpopulationen anhand des Simultest™ IMK

7.6 Intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten

IL2 CD3 UNST	IL2 CD3 STIM	IL2 CD4 UNST	IL2 CD4 STIM	IL2 CD8 UNST	IL2 CD8 STIM	INF/IL4 CD3 UNST	INF/IL4 CD3 STIM	INF/IL4 CD4 UNST	INF/IL4 CD4 STIM	INF/IL4 CD8 UNST	INF/IL4 CD8 STIM	IL10 CD3 UNST	IL10 CD3 STIM	IL10 CD4 UNST	IL10 CD4 STIM	IL10 CD8 UNST	IL10 CD8 STIM
Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2	Pellet 1	Pellet 2
1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg	1,5 ml RPMI Blut	1,5 ml RPMI Blut m. 11,25µl PMA und 18,75µl Iono-Lsg
Inkubation im Brutschrank bei 37°C in Anwesenheit von 7% CO ₂ für 1 h.																	
Zugabe von jeweils 30 µl BF-A																	
Inkubation im Brutschrank bei 37°C in Anwesenheit von 7% CO ₂ für 3 h.																	
Entnahme von jeweils 100 µl Probevolumen in ein FACS-Röhrchen (18 Stück).																	
7,5µl CD3	7,5µl CD3	10µl CD4	10µl CD4	7,5µl CD8	7,5µl CD8	7,5µl CD3	7,5µl CD3	10µl CD4	10µl CD4	7,5µl CD8	7,5µl CD8	7,5µl CD3	7,5µl CD3	10µl CD4	10µl CD4	7,5µl CD8	7,5µl CD8
Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min.																	
Zugabe von jeweils 900 µl FACS-Lysing Solution und Lyse für 60 min.																	
2x Zugabe von jeweils 2 ml Washingbuffer und zentrifugieren bei 2000 U/min und 24°C für 5 min, dann absaugen.																	
Zugabe von jeweils 500 µl Permeabilizing Solution und permeabilisieren für 10 min.																	
2x Zugabe von jeweils 2 ml Washingbuffer und zentrifugieren bei 2000 U/min und 24°C für 5 min, dann absaugen.																	
7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-IL2	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-INF/ Anti-IL4	7,5 µl Anti-IL10	7,5 µl Anti-IL10	7,5 µl Anti-IL10	7,5 µl Anti-IL10	7,5 µl Anti-IL10	7,5 µl Anti-IL10
Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min.																	
2x Zugabe von jeweils 2 ml Washingbuffer und zentrifugieren bei 2000 U/min und 24°C für 5 min, dann absaugen.																	
500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%	500 µl PFA 1%
10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin	10 µl Saponin

Abb. 40: Inkubationsschema zur Bestimmung des Anteils an zytokinproduzierenden, CD3, CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten; Unst: unstimuliert; Stim: stimuliert; PMA: Phorbol-myristat-acetat; Iono: Ionomycin; BF-A: Brefeldin A; PFA: Paraformaldehyd 1%

8.0 Geräte und Material

8.1. Geräte

Begasungsbrutschrank (BB16): Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Blockthermostat (BT 3): Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Cambridge, England (Nr. 729113008)

Destillierungsanlage (Aqua_{Bidest.}): Milli-Q Water System-Millipore S.A., Molsheim, Frankreich (Nr. F5P25539Q)

Durchflußzytometer: FACScan™-Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Kalifornien, USA (Nr. 81614)

CELLQuestPro Software Becton Dickinson Biosciences, Kalifornien, USA

Probenschüttler: VF 2-Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland (Nr. 751092)

Ultraschallbad: Sonorex Super Rk 510 H - Bandelin electronic, Berlin, Deutschland (Nr. 321117155)

Zellzähler: Coulter Counter Multisizer II - Coulter Electronics Ltd., Luton, England (NR. Y0200074)

Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3 S-R - Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland (Nr. 40121305)

8.2. Laborbedarf

Eppendorf Multipette plus Combitips (Größen: 0,5 ml; 1 ml; 10 ml); Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Eppendorfhütchen (Größen: 1,5 ml; 2 ml) in weiß und braun; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Heparin-Natrium Braun 100 IE/ml - B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

Injekt 10 ml - B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Injekt 20 ml - B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Messkuevette für Coulter Counter; Coulter Electronics Ltd., Luton, England

NUNCLON™ Multischalen Polystyrol; Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Pipetten: Eppendorf Reference (Bereich: 0,5 µl – 10 µl; 10 µl – 100 µl; 100 µl -1000 µl); Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen (Größen: 0,5 µl – 10 µl; 10 µl – 100 µl; 250 µl -1000 µl); Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Polypropylene Röhrchen (Größe: 12 ml); Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Probenbehälter: FALCON Polypropylene Round Bottom Tubes (Größe: 5 ml); Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Probengefäß mit Ethylen-Diamine-Tetra-Acetate-Kalium (EDTA-K), 2,3ml - Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

8.3 Puffer und Lösungen

FACSFlow™: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS): Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA; zur Herstellung dieser Pufferlösung werden 9,8 g des HBSS-Trockenpulvers unter Zugabe von 5 ml 2 M Hepeslösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in 1 l destilliertem Wasser aufgelöst und mit 2 N Natronlauge (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

HBBA-Puffer: 2,50 g 0,5% bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) werden mit 0,25 g NaN_3 (0,05%) (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml HBSS gelöst.

Histopaque®-1077: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; Dichtegradient für die Isolation mononukleärer Zellen, bestehend aus 5,7 g/l Polysaccharose und 9,0 g/l Natriumdiatrizoat

ISOTON II: Beckman Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld, Deutschland

Paraformaldehyd 1% (PFA)

Phosphate Buffered Saline (PBS): Für 1 l PBS 10-fach Konzentrat werden in 900 ml $\text{Aqua}_{\text{dest.}}$ 69,2 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 14,2 g Na_2HPO_4 (Fluka AG, Taufkirchen, Deutschland) und 1,0 g Na_2EDTA (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) gelöst, mit 2 N HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und dann mit $\text{Aqua}_{\text{dest.}}$ auf 1000 ml gefüllt.

RPMI-Lösung: Sigma, Taufkirchen, Deutschland; RPMI-1640 in Lösung mit 117 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Washing Buffer: Für 1000 ml werden 100 ml PBS (10fach Konzentrat) mit 900 ml $\text{Aqua}_{\text{dest.}}$ unter Zugabe von 5g BSA und 1g NaN_3 gemischt.

8.4 Reagenzien

8.4.1 Antikörper

CD3 - Antikörper: (Nr. 345766) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

CD4 - Antikörper: (Nr. 345770) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

CD8 - Antikörper: (Nr. 345774) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

FastImmune™ Anti-Hu-IL-2 FITC: (Nr. 340448) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

FastImmune™ IFN- γ FITC / IL-4 PE: (Nr. 340456) Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Anti-Hu/viral IL-10: (Nr. 559337) Pharmingen, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

IB4: FITC markierter, monoklonaler Antikörper (IgG2a) gegen CD11b/CD18 (β 2-Integrine) in einer Konzentration von 100 μ g/ml; freundlicherweise von Prof. Dr. K.-E. Arfors (Experimental Medicine Incorporation, New Jersey, Princeton, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Die Arbeitslösung wird im Verhältnis 1:10 mit HBBA verdünnt.

Dreg 200 (D200): FITC markierter, monoklonaler Antikörper (IgG2a) gegen CD62L (L-Selektin-moleküle) in einer Konzentration von 100 μ g/ml; freundlicherweise von Prof. Dr. K.-E. Arfors (Experimental Medicine Incorporation, New Jersey, Princeton, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Die Arbeitslösung wird im Verhältnis 1:10 mit HBBA verdünnt.

Simultest™ IMK-Lymphocyte: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

8.4.2 Reagenzien

Brefeldin A (BFA): Sigma, Taufkirchen, Deutschland; für eine 5 mg/ml Stammlösung von BFA (MG 280,4 g/mol) werden 10 mg in 2 ml Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Für die Arbeitslösung wird die Stammlösung mit 180 μ l RPMI verdünnt (c = 0,5 mg/ml)

Calcium Ionophore A23187 (A23): Sigma, Taufkirchen, Deutschland; für eine 1 mM Stammlösung von A23 (MG 523,6 g/mol) werden 1 mg in 1,90 ml DMSO gelöst; für die Arbeitslösung wird die Stammlösung mit 90 μ l HBSS versetzt.

Dihydrorhodamin 123 (DHR): MoBiTec, Göttingen, Deutschland; für die Stammlösung werden 10 mg DHR (MG 346 g/mol) in 26,2 ml Dimethylformamid (DMF) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Die Arbeitslösung erhält man durch Verdünnung von 100 μ l der 1,1 mM Stammlösung mit 900 μ l HBSS.

FACS™ Lysing Solution: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; die Arbeitslösung wird mit 1:10 Aqua_{dest.} verdünnt.

FACS™ Permeabilizing Solution: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; die Arbeitslösung wird mit 1:10 Aqua_{dest.} verdünnt.

Floureszeinthiocyanat (FITC) markiertes Zymosan A von *Saccharomyces cerevisiae*: FITC Fluos - Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland; Zymosan A - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; für die Arbeitslösung werden 10 mg Nassgewicht Zymosan in 1 ml NaHCO₃ 8,4 % (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und nach Zusatz von 0,85 mg FITC Fluos, versetzt mit 850 µl DMSO, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier Waschvorgängen mit NaCl 0,9 % (DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland) und einem mit HBSS, werden 100 ml HBSS resuspendiert und man erhält eine Konzentration der Arbeitslösung von 10 mg/ml.

***n*-Formyl-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin (FMLP):** Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; für die Stammlösung werden 50 mg FMLP (MG 437,6 g/mol) in 114,3 ml DMF gelöst. Die Arbeitslösung erhält man durch Verdünnung von 10 µl der 1 mM Stammlösung mit 990 µl HBSS.

Ionomycin: Sigma, Taufkirchen, Deutschland; für eine 1 mg/ml Stammlösung Ionomycin (MG 747,1 g/mol) wird 1 mg in 1 ml DMSO gelöst. Für die Arbeitslösung wird die Stammlösung mit 90 µl PBS verdünnt ($c = 0,1$ mg/ml).

Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA): Sigma, Taufkirchen, Deutschland; für eine 1 mM Stammlösung von PMA (MG 616,8 g/mol) werden 1 mg in 1,62 ml DMF gelöst. Die Arbeitslösung erhält man durch Verdünnung von 10 µl der 1 mM Stammlösung mit 990 µl HBSS.

Propidiumjodid (PI): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; für die Arbeitslösung werden 25 mg von PI (MG 668,4 g/mol) in 12,5 ml NaCl 0,9 %, gepuffert mit 5 mM Hepeslösung, gelöst, und man erhält eine Konzentration von 3 mM.

Quinolinium, 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl, Perchlorat (LDS): MoBiTec, Göttingen, Deutschland; für die Stammlösung werden 5 mg LDS (MG 471,98 g/mol) in 100 ml DMSO gelöst. Die Arbeitslösung erhält man durch Verdünnung der Stammlösung ($c = 50$ µg/ml) mit HBSS in einem Verhältnis 1:10.

Salzsäure (HCl): Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Saponin: Sigma, Taufkirchen, Deutschland; für eine 10 mg/ml Arbeitslösung werden 1 g Saponin (MG 280,4 g/mol) und 1 g NaN₃ gemischt.

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; für die Arbeitslösung wird die Originalsuspension mit 9 ml einer Pufferlösung, bestehend aus PBS-Puffer und 0,1 % bovinem Serumalbumin verdünnt, wodurch man eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/l}$ erhält.

Zymosan A von *Saccharomyces cerevisiae*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland; für die Arbeitslösung werden 1000 mg an trockenem Zymosanpulver in 100 ml NaCl 0,9 % für 2 Minuten gekocht und anschließend für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Einem zweimaligen Waschvorgang mit NaCl 0,9 % folgt eine Resuspendierung des Zymosans mit 100 ml HBSS. Nach Abtrennung von groben Partikeln wird die Lösung zentrifugiert (5 min bei 5000 G) und das entstandene Pellet zur Bestimmung des Nassgewichtes gewogen. Durch erneute Resuspendierung mit 100 ml HBSS erhält man eine Arbeitslösung mit der Konzentration von 10 mg/ml.

9.0 Perioperative Algorithmen

9.1 Algorithmus zur Volumensubstitution / Katecholamingabe

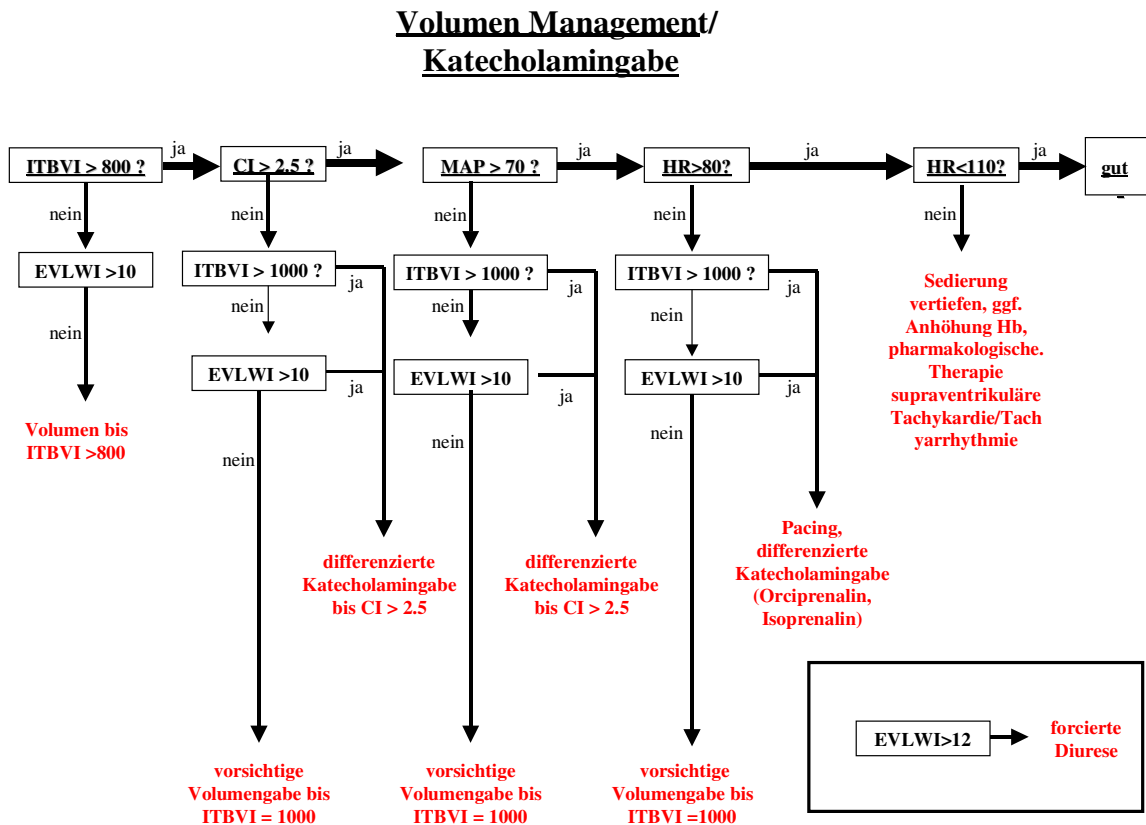


Abb. 41: Angewendetes perioperatives Schema zur Volumengabe und Katecholamingabe

9.2 Algorithmus für die perioperative mechanische Ventilation

Volumen kontrollierte Beatmung

Peep $6 \pm \text{cm H}_2\text{O}$

FiO₂ adaptiert an PaO₂ (PaO₂ $\geq 100 \text{ mmHg}$)

Tidalvolumen: 6 - 8 ml/kg Ideales Körpergewicht

Ideales Körpergewicht:

männlich: $50 + 2,3[\text{Grösse (cm)} \times 2,54^{-1} - 60]$

weiblich: $45,5 + 2,3[\text{Grösse (cm)} \times 2,54^{-1} - 60]$

9.3 Algorithmus für die Extubation

Patient ist wach und kontaktfähig, befolgt Aufforderungen
 Schutzreflexe vollständig vorhanden
 adäquate Atemmechanik, f / V_t ratio < 105 , Atemfrequenz $< 30 / \text{min}$
 Horowitz-Index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) > 200 , $\text{PaCO}_2 < 55 \text{ mmHg}$
 pH-Wert $> 7,25$ und $< 7,5$
 $\text{MAP} \geq 70 \text{ mmHg}$

[Nach: Esteban A., Alia I. *Int. Care Med.* 98; 24:999-1008
 Cheng DCH et al. *Anest. Analg.* 2001; 92:1094-1102]

9.4 Algorithmus für das postoperative Abschalten des Pacers

Versuch den Pacer abzuschalten alle 6 - 8 Stunden postoperativ
 Eigenfrequenz $> 65/\text{min}$
 MAP Abfall $\leq 15 \text{ mm Hg}$, oder keine Erhöhung der Katecholamindosis erforderlich
 (EKG wird direkt postoperativ installiert und läuft bis Entlassung von der Intensivstation)

9.5 Algorithmus für die Verlegung von Intensivstation auf Normalstation

Patient ist extubiert mobilisierbar und kooperativ
 Zufriedenstellender Gasaustausch, PaO_2 bei Raumluft $> 50 \text{ mmHg}$, Normokapnie
 $\text{CK-MB} \leq 20 \text{ ng/ml}$ oder abfallend, im 12-Kanal EKG keine akuten Ischämiezeichen
 Keine Anzeichen einer bedrohlichen Infektion oder Organdysfunktion
 Thoraxdrainage fördert $< 50 \text{ ml/h}$
 Diurese $> 0,5 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
 Keine inotrope Medikation oder Vasopressoren (ausser Digoxin/Digitoxin)
 [Cheng DCH et al. *Anest. Analg.* 2001; 92:1094-1102]

9.6 Algorithmus für die Krankenhausentlassung

Keine Anzeichen einer bedrohlichen Infektion oder Organdysfunktion
 Keine inotrope Medikation oder Vasopressoren (ausser Digoxin/Digitoxin)
 Patient ist ohne Hilfe vollständig mobilisiert
 reizlose Wundverhältnisse oder Wundheilung abgeschlossen
 Myokardmarker im Normbereich oder abfallend

10.0 Abkürzungen

A23	Kalسيوم Ionophore A23187
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
APC	Antigen präsentierende Zelle
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BD	Becton Dickinson
BMI	Body Maß Index
BP	Bandpaß
BSA	bovines Serumalbumin
CI	Herzindex
CK-MB	Kreatinkinase MB
CR3	Komplementrezeptor Typ 3
CRH	Corticotropin releasing Hormon
CRP	Kapsel-reaktives Protein
DHR	Dihydrorhodamin 123
EKG	Elektrokardiogramm
EVLWI	Extravaskulärer Lungenwasserindex
FACS	Flourescence activated Cell Sorter Scan
FITC	Floureszeinthiocyanat
FL	Fluoreszenz-Kanal
fMLP	n-Formyl-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HR	Herzfrequenz
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immungolbulin G
IL	Interleukin

ITBVI	Intrathorakaler Blutvolumenindex
LDS	Quinolinium, 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl, Perchlorate
LP	Langpaß
MODS	Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Hydrogenase
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Nitrid-Oxid
NRL	Non-Routine-Labor
OMVE	Omegaven
OPCAB	Off Pump Coronary Artery Bypass
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMNL	Polymorphonukleärer neutrophiler Leukozyt
RVAD	Right Ventricular Assist Device
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Side Scatter
STZ	Serum treated Zymosan
TH	T-Helferzelle
TISS	Therapeutic Intervention Scoring System
TLR	Toll like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Zym	Zymosan

11.0 Literaturverzeichnis

1. Akbas H, Erdal AC, Demiralp E, Alp M: **Effects of coronary artery bypass grafting on cellular immunity with or without cardiopulmonary bypass: changes in lymphocytes subsets.** *Cardiovasc Surg* 2002, **10**(6):586-589.
2. Ankersmit HJ, Tugulea S, Spanier T, Weinberg AD, Artrip JH, Burke EM, Flannery M, Mancini D, Rose EA, Edwards NM *et al*: **Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist device.** *Lancet* 1999, **354**(9178):550-555.
3. Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M: **Impairment of several immune functions in anxious women.** *J Psychosom Res* 2007, **62**(1):1-8.
4. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Gomes WJ, Angelini GD: **On-pump versus off-pump coronary revascularization: evaluation of renal function.** *Ann Thorac Surg* 1999, **68**(2):493-498.
5. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD: **Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass.** *Ann Thorac Surg* 2000, **69**(4):1198-1204.
6. Asman B, Gustafsson A, Bergstrom K: **Priming of neutrophils with tumor necrosis factor-alpha measured as Fc gamma receptor-mediated respiratory burst correlates with increased complement receptor 3 membrane density.** *Int J Clin Lab Res* 1996, **26**(4):236-239.
7. Beckman JS, Koppenol WH: **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *Am J Physiol* 1996, **271**(5 Pt 1):C1424-1437.
8. Beghetti M, Silkoff PE, Caramori M, Holtby HM, Slutsky AS, Adatia I: **Decreased exhaled nitric oxide may be a marker of cardiopulmonary bypass-induced injury.** *Ann Thorac Surg* 1998, **66**(2):532-534.
9. Bellavite P, Dri P, Della Bianca V, Serra MC: **The measurement of superoxide anion production by granulocytes In whole blood. A clinical test for the evaluation of phagocyte function and serum opsonic capacity.** *Eur J Clin Invest* 1983, **13**(4):363-368.
10. Bidlack JM: **Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**(5):719-723.
11. Bilfinger TV, Fimiani C, Stefano GB: **Morphine's immunoregulatory actions are not shared by fentanyl.** *Int J Cardiol* 1998, **64** Suppl 1:S61-66.

12. Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT: **Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes.** *J Immunol* 1997, **158**(12):5589-5595.
13. Bogh LD, Duling TA: **Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories.** *Clin Lab Sci* 1993, **6**(3):167-173.
14. Boldt J, Brosch C, Piper SN, Suttner S, Lehmann A, Werling C: **Influence of prophylactic use of pentoxifylline on postoperative organ function in elderly cardiac surgery patients.** *Crit Care Med* 2001, **29**(5):952-958.
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** *Chest* 1992, **101**(6):1644-1655.
16. Bone RC: **Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation.** *Crit Care Med* 1996, **24**(1):163-172.
17. Bone RC: **Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.** *Crit Care Med* 1996, **24**(7):1125-1128.
18. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED: **Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response.** *Ann Thorac Surg* 1997, **63**(1):277-284.
19. Brand JM, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P: **The effects of general anesthesia on human peripheral immune cell distribution and cytokine production.** *Clin Immunol Immunopathol* 1997, **83**(2):190-194.
20. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S: **Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans.** *J Exp Med* 2003, **197**(9):1119-1124.
21. Brown GD: **Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(1):33-43.
22. Cagli K, Ulas MM, Ozisik K, Kale A, Bakuy V, Emir M, Balci M, Topbas M, Sener E, Tasdemir O: **The intraoperative effect of pentoxifylline on the inflammatory process and leukocytes in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass.** *Perfusion* 2005, **20**(1):45-51.
23. Calo L, Bianconi L, Colivicchi F, Lamberti F, Loricchio ML, de Ruvo E, Meo A, Pandozi C, Staibano M, Santini M: **N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial.** *J Am Coll Cardiol* 2005, **45**(10):1723-1728.

24. Caputo M, Yeatman M, Narayan P, Marchetto G, Ascione R, Reeves BC, Angelini GD: **Effect of off-pump coronary surgery with right ventricular assist device on organ function and inflammatory response: a randomized controlled trial.** *Ann Thorac Surg* 2002, **74**(6):2088-2095; discussion 2095-2086.
25. Cavarocchi NC, England MD, Schaff HV, Russo P, Orszulak TA, Schnell WA, Jr., O'Brien JF, Pluth JR: **Oxygen free radical generation during cardiopulmonary bypass: correlation with complement activation.** *Circulation* 1986, **74**(5 Pt 2):III130-133.
26. Christenson JT, Aeberhard JM, Badel P, Pepcak F, Maurice J, Simonet F, Velebit V, Schmuziger M: **Adult respiratory distress syndrome after cardiac surgery.** *Cardiovasc Surg* 1996, **4**(1):15-21.
27. Corcoran TB, Engel A, Sakamoto H, O'Callaghan-Enright S, O'Donnell A, Heffron JA, Shorten G: **The effects of propofol on lipid peroxidation and inflammatory response in elective coronary artery bypass grafting.** *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004, **18**(5):592-604.
28. Cotran RS, Pober JS: **Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in vascular and immune injury.** *Kidney Int* 1989, **35**(4):969-975.
29. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV: **Modulation of endotoxin-induced endothelial function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase.** *Shock* 2003, **20**(2):176-182.
30. Davies MG, Hagen PO: **Systemic inflammatory response syndrome.** *Br J Surg* 1997, **84**(7):920-935.
31. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, Miller-Graziano CL: **Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression.** *Clin Immunol* 2000, **96**(1):52-66.
32. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, Frugoni C, Zanardo G, Turolla L, Calo MA, Rosi P, Nieri A, Simini G: **The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity.** *Thorac Cardiovasc Surg* 1994, **42**(1):14-20.
33. de Vroeghe R, van Oeveren W, van Klarenbosch J, Stooker W, Huybregts MA, Hack CE, van Barneveld L, Eijssman L, Wildevuur CR: **The impact of heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits on pulmonary function and the release of inflammatory mediators.** *Anesth Analg* 2004, **98**(6):1586-1594, table of contents.
34. Dehoux MS, Hernot S, Asehnoune K, Boutten A, Paquin S, Lecon-Malas V, Toueg ML, Desmonts JM, Durand G, Philip I: **Cardiopulmonary bypass decreases cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cells: roles of interleukin-10 and the extracorporeal circuit.** *Crit Care Med* 2000, **28**(6):1721-1727.

35. Delogu G, Moretti S, Antonucci A, Marcellini S, Masciangelo R, Famularo G, Signore L, De Simone C: **Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes.** *Arch Surg* 2000, **135**(10):1141-1147.
36. Delogu G, Moretti S, Marcellini S, Antonucci A, Tellan G, Marandola M, Signore M, Famularo G: **Pancuronium bromide, a non-depolarizing muscle relaxant which promotes apoptosis of blood lymphocytes in vitro.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2003, **47**(9):1138-1144.
37. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA: **The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands.** *J Cell Biol* 1993, **120**(4):1031-1043.
38. Diegeler A, Tarnok A, Rauch T, Haberer D, Falk V, Battellini R, Autschbach R, Hamsch J, Schneider P, Mohr FW: **Changes of leukocyte subsets in coronary artery bypass surgery: cardiopulmonary bypass versus 'off-pump' techniques.** *Thorac Cardiovasc Surg* 1998, **46**(6):327-332.
39. Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM, Eckenhoff MF: **Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity.** *Anesthesiology* 2004, **101**(3):703-709.
40. Ege T, Arar C, Canbaz S, Cikirikcioglu M, Sunar H, Yuksel V, Duran E: **The importance of aprotinin and pentoxifylline in preventing leukocyte sequestration and lung injury caused by protamine at the end of cardiopulmonary bypass surgery.** *Thorac Cardiovasc Surg* 2004, **52**(1):10-15.
41. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP: **Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications.** *Proc Assoc Am Physicians* 1996, **108**(5):374-381.
42. Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP: **Cytokine dysregulation, inflammation and well-being.** *Neuroimmunomodulation* 2005, **12**(5):255-269.
43. Elliott MJ, Finn AH: **Interaction between neutrophils and endothelium.** *Ann Thorac Surg* 1993, **56**(6):1503-1508.
44. Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J: **A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123.** *J Immunol Methods* 1990, **131**(2):269-275.
45. Fattorossi A, Nisini R, Pizzolo JG, D'Amelio R: **New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis.** *Cytometry* 1989, **10**(3):320-325.

46. Feindt P, Litmathe J, Boeken U, Gams E: **Anticoagulation during extracorporeal circulation under conditions of an ongoing systemic inflammatory response syndrome: effects of heparin.** *Perfusion* 2005, **20**(1):11-15.
47. Fernandez V, Andersson J, Andersson U, Troye-Blomberg M: **Cytokine synthesis analyzed at the single-cell level before and after revaccination with tetanus toxoid.** *Eur J Immunol* 1994, **24**(8):1808-1815.
48. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL: **Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide.** *Science* 1992, **257**(5068):387-389.
49. Follin P, Dahlgren C: **Phagocytosis by lipopolysaccharide-primed human neutrophils is associated with increased extracellular release of reactive oxygen metabolites.** *Inflammation* 1992, **16**(2):83-91.
50. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward PA: **C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells.** *J Clin Invest* 1994, **94**(3):1147-1155.
51. Franke A, Lante W, Kurig E, Zoller LG, Weinhold C, Markewitz A: **Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood?** *Eur J Cardiothorac Surg* 2006, **30**(1):64-71.
52. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM: **Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2.** *J Exp Med* 2003, **197**(9):1107-1117.
53. Gilliland HE, Armstrong MA, Uprichard S, Clarke G, McMurray TJ: **The effect of aprotinin on interleukin-8 concentration and leukocyte adhesion molecule expression in an isolated cardiopulmonary bypass system.** *Anaesthesia* 1999, **54**(5):427-433.
54. Goetzman EA: **Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics.** *Clin Lab Sci* 1993, **6**(3):177-182.
55. Golbasi I, Akbas H, Ozdem S, Ukan S, Ozdem SS, Kabukcu H, Turkay C, Bayezid O: **The effect of pentoxifylline on haemolysis during cardiopulmonary bypass in open-heart surgery.** *Acta Cardiol* 2006, **61**(1):7-11.
56. Gong J, Larsson R, Ekdahl KN, Mollnes TE, Nilsson U, Nilsson B: **Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vitro model.** *J Clin Immunol* 1996, **16**(4):222-229.
57. Grover FL: **The Society of Thoracic Surgeons National Database: current status and future directions.** *Ann Thorac Surg* 1999, **68**(2):367-373; discussion 374-366.

58. Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: **Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence.** *Behav Brain Res* 2002, **134**(1-2):41-48.
59. Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: **Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence.** *Exp Gerontol* 2002, **37**(2-3):249-256.
60. Guayerbas N, De La Fuente M: **An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice.** *Dev Comp Immunol* 2003, **27**(4):339-350.
61. Hadj A, Esmore D, Rowland M, Pepe S, Schneider L, Lewin J, Rosenfeldt F: **Pre-operative preparation for cardiac surgery utilising a combination of metabolic, physical and mental therapy.** *Heart Lung Circ* 2006, **15**(3):172-181.
62. Heinzelmann M, Gardner SA, Mercer-Jones M, Roll AJ, Polk HC, Jr.: **Quantification of phagocytosis in human neutrophils by flow cytometry.** *Microbiol Immunol* 1999, **43**(6):505-512.
63. Herre J, Gordon S, Brown GD: **Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages.** *Mol Immunol* 2004, **40**(12):869-876.
64. Hiramoto R, Bernecky J, Jurand J, Hamlin M: **The Effect of Hydrogen Ion Concentration on Fluorescent Labelled Antibodies.** *J Histochem Cytochem* 1964, **12**:271-274.
65. Holzer K, Thiel M, Moritz S, Kreimeier U, Messmer K: **Expression of adhesion molecules on circulating PMN during hyperdynamic endotoxemia.** *J Appl Physiol* 1996, **81**(1):341-348.
66. Holzer K, Konietzny P, Wilhelm K, Encke A, Henrich D: **Phagocytosis by emigrated, intra-abdominal neutrophils is depressed during human secondary peritonitis.** *Eur Surg Res* 2002, **34**(4):275-284.
67. Homburger JA, Meiler SE: **Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome.** *Curr Opin Anaesthesiol* 2006, **19**(4):423-428.
68. Hong D, Stevens P: **The role of protein synthesis in the chemotaxis and chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes.** *Pharmacology* 1984, **28**(5):281-288.
69. Hutcheson IR, Griffith TM: **Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow.** *Am J Physiol* 1991, **261**(1 Pt 2):H257-262.
70. Hynes RO: **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell* 1992, **69**(1):11-25.

71. Ide H, Kakiuchi T, Furuta N, Matsumoto H, Sudo K, Furuse A, Asano K: **The effect of cardiopulmonary bypass on T cells and their subpopulations.** *Ann Thorac Surg* 1987, **44**(3):277-282.
72. Iskesen I, Saribulbul O, Cerrahoglu M, Onur E, Destan B, Sirin BH: **Pentoxifylline affects cytokine reaction in cardiopulmonary bypass.** *Heart Surg Forum* 2006, **9**(6):E883-887.
73. Jaeger K, Scheinichen D, Heine J, Andre M, Bund M, Piepenbrock S, Leuwer M: **Remifentanyl, fentanyl, and alfentanil have no influence on the respiratory burst of human neutrophils in vitro.** *Acta Anaesthesiol Scand* 1998, **42**(9):1110-1113.
74. Johnson KL: **Basics of flow cytometry.** *Clin Lab Sci* 1992, **5**(1):22-24.
75. Jutila MA, Watts G, Walcheck B, Kansas GS: **Characterization of a functionally important and evolutionarily well-conserved epitope mapped to the short consensus repeats of E-selectin and L-selectin.** *J Exp Med* 1992, **175**(6):1565-1573.
76. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M: **Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity.** *Shock* 2006, **26**(3):254-261.
77. Kaufmann I, Eisner C, Richter P, Hugel V, Beyer A, Chouker A, Schelling G, Thiel M: **Psychoneuroendocrine stress response may impair neutrophil function in complex regional pain syndrome.** *Clin Immunol* 2007, **125**(1):103-111.
78. Kaufmann I, Eisner C, Richter P, Hugel V, Beyer A, Chouker A, Schelling G, Thiel M: **Lymphocyte subsets and the role of TH1/TH2 balance in stressed chronic pain patients.** *Neuroimmunomodulation* 2007, **14**(5):272-280.
79. Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, Inada S: **Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury.** *Can J Anaesth* 1993, **40**(11):1016-1021.
80. Khan HA: **Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence response of circulating and extravasated leukocytes in experimental sepsis.** *Mediators Inflamm* 2004, **13**(2):123-125.
81. Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP: **Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989, **98**(3):381-385.
82. Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, Nagy A, Schuetz A, Lamm P, Knoll A *et al*: **Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery.** *Crit Care Med* 2003, **31**(4):1068-1074.

83. Kinsey BM, Kassis AI, Fayad F, Layne WW, Adelstein SJ: **Synthesis and biological studies of iodinated (127/125I) derivatives of rhodamine 123.** *J Med Chem* 1987, **30**(10):1757-1761.
84. Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC: **Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(6):2244-2248.
85. Klebanoff SJ: **Myeloperoxidase.** *Proc Assoc Am Physicians* 1999, **111**(5):383-389.
86. Koch T, Heller S, van Ackern K, Schiefer HG, Neuhof H: **Impairment of bacterial clearance induced by norepinephrine infusion in rabbits.** *Intensive Care Med* 1996, **22**(7):637-643.
87. Koh KB: **Emotion and immunity.** *J Psychosom Res* 1998, **45**(2):107-115.
88. Kollef MH, Wragge T, Pasque C: **Determinants of mortality and multiorgan dysfunction in cardiac surgery patients requiring prolonged mechanical ventilation.** *Chest* 1995, **107**(5):1395-1401.
89. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC: **The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist.** *Anesthesiology* 2002, **97**(1):215-252.
90. Larman J, Theilmeier G: **Inflammatory response to cardiac surgery: cardiopulmonary bypass versus non-cardiopulmonary bypass surgery.** *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004, **18**(3):425-438.
91. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT: **Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group.** *Ann Intern Med* 1998, **128**(3):194-203.
92. Mangano DT: **Effects of acadesine on myocardial infarction, stroke, and death following surgery. A meta-analysis of the 5 international randomized trials. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group.** *Jama* 1997, **277**(4):325-332.
93. Markewitz A, Faist E, Lang S, Hultner L, Weinhold C, Reichart B: **An imbalance in T-helper cell subsets alters immune response after cardiac surgery.** *Eur J Cardiothorac Surg* 1996, **10**(1):61-67.
94. Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl K, Kuhlmann WD, Weinhold C: **Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions.** *Shock* 2001, **16** Suppl 1:10-15.

95. Martinez-Pellus AE, Merino P, Bru M, Canovas J, Seller G, Sapina J, Fuentes T, Moro J: **Endogenous endotoxemia of intestinal origin during cardiopulmonary bypass. Role of type of flow and protective effect of selective digestive decontamination.** *Intensive Care Med* 1997, **23**(12):1251-1257.
96. Matata BM, Sosnowski AW, Galinanes M: **Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation.** *Ann Thorac Surg* 2000, **69**(3):785-791.
97. Matsuoka H, Kurosawa S, Horinouchi T, Kato M, Hashimoto Y: **Inhalation anesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro.** *Anesthesiology* 2001, **95**(6):1467-1472.
98. McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM: **Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: contrasting response between patients and isolated CPB circuits.** *Br J Anaesth* 1995, **75**(6):724-733.
99. McBride WT, McBride SJ: **The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in cardiac surgery.** *Curr Opin Anaesthesiol* 1998, **11**(1):15-22.
100. Mollhoff T, Loick HM, Van Aken H, Schmidt C, Rolf N, Tjan TD, Asfour B, Berendes E: **Milrinone modulates endotoxemia, systemic inflammation, and subsequent acute phase response after cardiopulmonary bypass (CPB).** *Anesthesiology* 1999, **90**(1):72-80.
101. Moudgil GC, Allan RB, Russell RJ, Wilkinson PC: **Inhibition, by anaesthetic agents, of human leucocyte locomotion towards chemical attractants.** *Br J Anaesth* 1977, **49**(2):97-105.
102. Moudgil GC: **Effect of premedicants, intravenous anaesthetic agents and local anaesthetics on phagocytosis in vitro.** *Can Anaesth Soc J* 1981, **28**(6):597-602.
103. Muret J, Marie C, Fitting C, Payen D, Cavaillon JM: **Ex vivo T-lymphocyte derived cytokine production in SIRS patients is influenced by experimental procedures.** *Shock* 2000, **13**(3):169-174.
104. Naldini A, Borrelli E, Cesari S, Giomarelli P, Toscano M: **In vitro cytokine production and T-cell proliferation in patients undergoing cardiopulmonary bypass.** *Cytokine* 1995, **7**(2):165-170.
105. Nebe CT: **[Flow cytometry and data analysis].** *Infusionsther Transfusionsmed* 1996, **23**(2):111-113.

106. Nuutila J, Lilius EM: **Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells.** *Cytometry A* 2005, **65**(2):93-102.
107. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Asbury AJ: **Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin.** *Br J Anaesth* 1992, **69**(1):70-74.
108. Paparella D, Yau TM, Young E: **Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2002, **21**(2):232-244.
109. Pavelkova M, Kubala L, Ciz M, Pavlik P, Wagner R, Slavik J, Ondrasek J, Cerny J, Lojek A: **Blood phagocyte activation during open heart surgery with cardiopulmonary bypass.** *Physiol Res* 2006, **55**(2):165-173.
110. Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C: **Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma.** *J Surg Res* 2000, **88**(2):200-206.
111. Picone AL, Lutz CJ, Finck C, Carney D, Gatto LA, Paskanik A, Searles B, Snyder K, Nieman G: **Multiple sequential insults cause post-pump syndrome.** *Ann Thorac Surg* 1999, **67**(4):978-985.
112. Prondzinsky R, Muller-Werdan U, Pilz G, Witthaut R, Stabenow I, Werdan K, Zerkowski HR: **[Systemic inflammatory reactions to extracorporeal therapy measures (II): Cardiopulmonary bypass].** *Wien Klin Wochenschr* 1997, **109**(10):346-353.
113. Puskas JD, Williams WH, Duke PG, Staples JR, Glas KE, Marshall JJ, Leimbach M, Huber P, Garas S, Sammons BH *et al*: **Off-pump coronary artery bypass grafting provides complete revascularization with reduced myocardial injury, transfusion requirements, and length of stay: a prospective randomized comparison of two hundred unselected patients undergoing off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, **125**(4):797-808.
114. Ranucci M, Mazzucco A, Pessotto R, Grillone G, Casati V, Porreca L, Maugeri R, Meli M, Magagna P, Cirri S *et al*: **Heparin-coated circuits for high-risk patients: a multicenter, prospective, randomized trial.** *Ann Thorac Surg* 1999, **67**(4):994-1000.
115. Ritchie AW, Gray RA, Micklem HS: **Right angle light scatter: a necessary parameter in flow cytofluorimetric analysis of human peripheral blood mononuclear cells.** *J Immunol Methods* 1983, **64**(1-2):109-117.
116. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schafer M, Stein C: **Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain.** *Anesthesiology* 2001, **95**(2):500-508.

117. Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ: **Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b.** *J Immunol* 1985, **134**(5):3307-3315.
118. Rothe G, Oser A, Valet G: **Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes.** *Naturwissenschaften* 1988, **75**(7):354-355.
119. Rothe G, Valet G: **Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes.** *Methods Enzymol* 1994, **233**:539-548.
120. Saadia R, Schein M: **Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model?** *J Accid Emerg Med* 1999, **16**(3):163-166; discussion 166-167.
121. Sablotzki A, Mann V, Simm A, Czeslick E: **[Changes in the cytokine network through escalating SIRS after heart surgery.].** *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2001, **36**(9):552-559.
122. Sacerdote P, Panerai AE, Frattola L, Ferrarese C: **Benzodiazepine-induced chemotaxis is impaired in monocytes from patients with generalized anxiety disorder.** *Psychoneuroendocrinology* 1999, **24**(2):243-249.
123. Sander B, Andersson J, Andersson U: **Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure.** *Immunol Rev* 1991, **119**:65-93.
124. Sander B, Hoiden I, Andersson U, Moller E, Abrams JS: **Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining.** *J Immunol Methods* 1993, **166**(2):201-214.
125. Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasproicz DJ, Fuchs BA, Street NE: **Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help.** *J Immunol* 1997, **158**(9):4200-4210.
126. Sayeed MM: **Alterations in calcium signaling and cellular responses in septic injury.** *New Horiz* 1996, **4**(1):72-86.
127. Sbrana S, Buffa M, Bevilacqua S, Spiller D, Parri MS, Gianetti J, De Filippis R, Clerico A: **Granulocyte- and monocyte-platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion.** *Cytometry B Clin Cytom* 2007, **72**(3):215-222.
128. Skrabal CA, Khosravi A, Choi YH, Kaminski A, Westphal B, Steinhoff G, Liebold A: **Pericardial suction blood separation attenuates inflammatory response and hemolysis after cardiopulmonary bypass.** *Scand Cardiovasc J* 2006, **40**(4):219-223.

129. Solana R, Alonso MC, Pena J: **Natural killer cells in healthy aging.** *Exp Gerontol* 1999, **34**(3):435-443.
130. Song C, Earley B, Leonard BE: **Behavioral, neurochemical, and immunological responses to CRF administration. Is CRF a mediator of stress?** *Ann N Y Acad Sci* 1995, **771**:55-72.
131. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy CJ, Dhonneur G, Duvaldestin P, Brochard L, Brun-Buisson C, Harf A, Delclaux C: **Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients.** *Crit Care Med* 2002, **30**(2):315-322.
132. Svenmarker S, Haggmark S, Jansson E, Lindholm R, Appelblad M, Sandstrom E, Aberg T: **Use of heparin-bonded circuits in cardiopulmonary bypass improves clinical outcome.** *Scand Cardiovasc J* 2002, **36**(4):241-246.
133. Takahashi T, Kunimoto F, Ichikawa H, Ishikawa S, Sato Y, Hasegawa Y, Morishita Y: **Gastric intramucosal pH and hepatic venous oximetry after cardiopulmonary bypass in valve replacement patients.** *Cardiovasc Surg* 1996, **4**(3):308-310.
134. Tallman RD, Dumond M, Brown D: **Inflammatory mediator removal by zero-balance ultrafiltration during cardiopulmonary bypass.** *Perfusion* 2002, **17**(2):111-115.
135. Tarnok A, Schneider P: **Pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathways contributing to transient systemic immune suppression.** *Shock* 2001, **16** Suppl 1:24-32.
136. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ: **Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients.** *Crit Care Med* 2002, **30**(5):1056-1061.
137. Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, Eysman L, Kesecioglu J: **Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebo-controlled trial.** *Lancet* 2001, **358**(9283):696-701.
138. Terstappen LW, Shah VO, Conrad MP, Recktenwald D, Loken MR: **Discriminating between damaged and intact cells in fixed flow cytometric samples.** *Cytometry* 1988, **9**(5):477-484.
139. Thiel M, Zourelidis C, Chambers JD, von Andrian UH, Arfors KE, Messmer K, Peter K: **Expression of beta 2-integrins and L-selectin on polymorphonuclear leukocytes in septic patients.** *Eur Surg Res* 1997, **29**(3):160-175.
140. Tonz M, Mihaljevic T, von Segesser LK, Fehr J, Schmid ER, Turina MI: **Acute lung injury during cardiopulmonary bypass. Are the neutrophils responsible?** *Chest* 1995, **108**(6):1551-1556.

141. Tschaikowsky K, Sittl R, Braun GG, Hering W, Rugheimer E: **Increased fMet-Leu-Phe receptor expression and altered superoxide production of neutrophil granulocytes in septic and posttraumatic patients.** *Clin Investig* 1993, **72**(1):18-25.
142. van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG: **Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst.** *J Immunol Methods* 1996, **191**(2):187-196.
143. Vetvicka V, Thornton BP, Ross GD: **Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells.** *J Clin Invest* 1996, **98**(1):50-61.
144. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC: **Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(17):7538-7542.
145. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP: **Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes.** *Clin Chim Acta* 2003, **331**(1-2):103-110.
146. Wan S, Marchant A, DeSmet JM, Antoine M, Zhang H, Vachier JL, Goldman M, Vincent JL, LeClerc JL: **Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996, **111**(2):469-477.
147. Westerberg M, Gabel J, Bengtsson A, Sellgren J, Eidem O, Jeppsson A: **Hemodynamic effects of cardiotomy suction blood.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, **131**(6):1352-1357.
148. Whitlock RP, Young E, Noora J, Farrokhyar F, Blackall M, Teoh KH: **Pulse low dose steroids attenuate post-cardiopulmonary bypass SIRS; SIRS I.** *J Surg Res* 2006, **132**(2):188-194.
149. Wittchen HU, Boyer P: **Screening for anxiety disorders. Sensitivity and specificity of the Anxiety Screening Questionnaire (ASQ-15).** *Br J Psychiatry Suppl* 1998(34):10-17.
150. Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA: **Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness.** *J Immunol* 1998, **161**(6):2723-2730.
151. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E: **T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns.** *Crit Care Med* 1999, **27**(1):66-72.

12. Danksagung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im experimentellen Labor der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Manfred Thiel, dem Leiter des Labors, möchte ich sehr herzlich für die Überlassung dieses äußerst spannenden und komplexen Themas, und für die Möglichkeit bei ihm arbeiten zu dürfen, danken. Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Ines Kaufmann für die Betreuung der gesamten Arbeit und die Hinführung zur Thematik.

Des Weiteren möchte ich mich auch für die kooperative Zusammenarbeit in dieser Studie bei Herrn Professor Dr. Alwin Goetz und Dr. Matthias Göpfert bedanken.

Meinem Kollegen und Freund Dr. Christoph Eisner danke ich für die exzellente Zusammenarbeit in diesem Projekt. Ebenso möchte ich mich bei meinem Freund Herrn PD Dr. Thomas Felbinger bedanken, der mir immer mit gutem Rat zur Seite gestanden ist und mir die Grundlagen des Fachs der Anästhesiologie gelehrt hat.

Den Labormitarbeitern Marion Höhrl, Gabi Gröger, Ursula Göttler, Stefan Meindl und Hans Wageneder und nicht zuletzt Herrn PD Dr. Alex Chouker gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre im Labor.

Mein grösster Dank gilt meiner Familie. Hier möchte ich mich ganz besonders für die kontinuierliche Unterstützung meines Werdegangs bei meiner Karen, ihren Eltern und bei meiner Mutter, Frau Dr. Hannelore Richter bedanken.

13. Lebenslauf

Name: Hans Peter Richter

Geburtsdatum: 18.September 1978

Geburtsort: München

Schulbildung:

09 / 1984	- 07 / 1988	Volksschule an der Dorfstraße Taufkirchen
09 / 1988	- 07 / 1991	Gymnasium der Benediktiner Schäftlarn
09 / 1991	- 12 / 1994	Theresien-Gymnasium München
01 / 1995	- 04 / 1995	Lycée E. Faure de Morteau, Frankreich
04 / 1995	- 06 / 1997	Theresien-Gymnasium München, Abitur am 27. Juni 1997

Zivildienst:

09 / 1997	- 09 / 1998	Pflegedienst auf der Station für angeborene Herzfehler im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter am Deutschen Herzzentrum der Technischen Universität München
-----------	-------------	--

Studium der Medizin:

11 / 1998	- 09 / 1999	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
10 / 1999	- 04 / 2001	Universität Ulm
04 / 2001		Ärztliche Vorprüfung
04 / 2001	- 05 / 2005	Ludwig-Maximilians-Universität München
03 / 2002		Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 / 2004		Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05 / 2005		Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05 / 2005		Approbation als Arzt

Fachweiterbildung:

09 / 2005	- dato	Assistenzarzt im Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
06 / 2008		Erwerb der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin